

POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN PLANTS**Publication number:** JP2002517255T**Publication date:** 2002-06-18**Inventor:****Applicant:****Classification:**







- International: C12N9/02; C12N15/82; C12P7/64; C12N9/02;
C12N15/82; C12P7/64; (IPC1-7): C12N15/09;
A01H5/00; C12P7/64

- european: C12N9/02L99B; C12N15/82C4B4; C12P7/64

Application number: JP20000553604T 19990610

Priority number(s): US19980089043P 19980612; WO1999US13559
19990610

Also published as:

 WO9964614 (A3)
 WO9964614 (A2)
 EP1086236 (A3)
 EP1086236 (A2)
 EP1086236 (A0)
 CA2330024 (A1)

less <<

Report a data error here

Abstract not available for JP2002517255T

Abstract of corresponding document: **WO9964614**

The present invention relates to compositions and methods for preparing polyunsaturated long chain fatty acids in plants, plant parts and plant cells, such as leaves, roots, fruits and seeds. Nucleic acid sequences and constructs encoding fatty acid desaturases, including DELTA 5-desaturases, DELTA 6-desaturases and DELTA 12-desaturases, are used to generate transgenic plants, plant parts and cells which contain and express one or more transgenes encoding one or more desaturases. Expression of the desaturases with different substrate specificities in the plant system permit the large scale production of polyunsaturated long chain fatty acids such as docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, alpha - linolenic acid, gamma-linolenic acid, arachidonic acid and the like for modification of the fatty acid profile of plants, plant parts and tissues. Manipulation of the fatty acid profiles allows for the production of commercial quantities of novel plant oils and products.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-517255
(P2002-517255A)

(43)公表日 平成14年6月18日(2002.6.18)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テームコード(参考)
C12N 15/09	ZNA	A01H 5/00	A 2B030
A01H 5/00		C12P 7/64	4B024
C12P 7/64		C12N 15/00	ZNAA 4B064

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁)

(21)出願番号 特願2000-553604(P2000-553604)
(86)(22)出願日 平成11年6月10日(1999.6.10)
(85)翻訳文提出日 平成12年12月11日(2000.12.11)
(86)国際出願番号 PCT/US99/13559
(87)国際公開番号 WO99/64614
(87)国際公開日 平成11年12月16日(1999.12.16)
(31)優先権主張番号 60/089,043
(32)優先日 平成10年6月12日(1998.6.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, MX, US

(71)出願人 カルジーン エルエルシー
アメリカ合衆国 95616 カリフォルニア
州, デイヴィス, フィフス ストリート
1920
(72)発明者 クヌーツオン, デビー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95746、
グラニテ・ベイ、ロツクハースト・ウェ
イ・6110
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)
Fターム(参考) 2B030 AD08 CA15 CA17 CA19
4B024 AA05 BA80 CA04 DA01 EA01
EA04 FA02 GA11 HA20
4B064 AD88 CA11 CA19 CC24 DA10

(54)【発明の名称】 植物における多価不飽和脂肪酸

(57)【要約】

本発明は、植物、植物部分、および植物細胞(葉、根、果実、および種など)中の多価不飽和長鎖脂肪酸調製用の組成物および調製法に関する。Δ5-不飽和化酵素、Δ6-不飽和化酵素、およびΔ12-不飽和化酵素を含む脂肪酸不飽和化酵素をコードする核酸配列および構築物を使用して、1つまたは複数の不飽和化酵素をコードする1つまたは複数の導入遺伝子を含み且つ発現するトランスジェニック植物、植物部分、および細胞を作製する。植物系において異なる基質特異性を有する不飽和化酵素の発現により、植物、植物部分および組織の脂肪酸プロファイルの改変用の多価不飽和長鎖脂肪酸(ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、α-リノレン酸、γ-リノレン酸、アラキドン酸など)が大量生産される。脂肪酸プロファイルの操作により、新規の植物油および製品の商業的量の産生が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物の種子中でのステアリドン酸の産生法であって、前記方法が、

前記植物のゲノムに、植物種子細胞中で機能的なプロモーター、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素をコードするDNA配列、および植物細胞中で機能的な転写終止領域を5' → 3'の転写方向で含む第1のDNA構築物を組込んだ植物を生長させる工程と、

前記植物を前記 $\Delta 6$ -不飽和化酵素が発現する条件下で生長させる工程とを含む方法。

【請求項2】 前記植物が、そのゲノムに組込まれた第2の構築物を有し、前記第2の構築物が、植物種子細胞中で機能的なプロモーターおよび $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードするDNA配列を5' → 3'方向の転写で有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記植物が、そのゲノムに組込まれた第2の構築物を有し、前記第2の構築物が、植物種子細胞中で機能的なプロモーターおよび $\Delta 15$ -不飽和化酵素をコードするDNA配列を5' → 3'方向の転写で有する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記不飽和化酵素をコードする配列がMortierella属由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記プロモーターがナピンプロモーターである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記プロモーターがダイズ β -コングリシン7Sサブユニット転写開始領域由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記方法が、前記植物種子からの油の抽出工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記油が、約5重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記油が、約10重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 前記油が、約15重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項11】 前記油が、約20重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項12】 前記油が、約25重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項13】 前記種子油に見られる全脂肪酸成分として5重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、種子。

【請求項14】 前記種子油の成分として約10重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項13に記載の種子。

【請求項15】 前記種子油の成分として約15重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項13に記載の種子。

【請求項16】 前記種子油の成分として約20重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項13に記載の種子。

【請求項17】 前記種子油の成分として約25重量%またはそれ以上のステアリドン酸を含む、請求項13に記載の種子。

【請求項18】 請求項13に記載の種子から得た種子油。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は、1998年6月19日に提出された米国特許仮出願第60/089,043号の利点を請求する。

【0002】

背景技術

本発明は、宿主植物中の長鎖多価不飽和脂肪酸(PUFAS)の産生を変化させることができる酵素および/または酵素成分のレベルの調整法に関する。本発明は、植物におけるPUFASの産生によって実施される。

【0003】

序論

背景

多価不飽和脂肪酸(PUFAS)の3つの主要なファミリーは、アラキドン酸、ミード酸(Mead acid)に代表される ω 9脂肪酸、およびエイコサペンタエン酸に代表される ω 3脂肪酸の3つの脂肪酸である。PUFAは、リン脂質の形態で見出され得る原形質膜の重要な成分である。PUFAはまた、プロスタサイクリン、ロイコトリエン、およびプロスタグランジンを含むヒトおよび動物に重要な他の分子の前駆体として作用する。PUFAは、正常な発達、特に乳児の脳の発達ならびに組織の形成および修復に必要である。

【0004】

4つの主要で重要な長鎖PUFAには、主に異なる型の魚油に見出されるドコサヘキサエン酸(DHA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)、多くの植物(サクラソウ(*Oenothera Biennis*)、ルリヂサ(*Borago officinalis*)、およびクロフサスグリ(*Ribes nigrum*)が含まれる)に見出される γ リノレン酸(GLA)、および魚油および植物油に見出されるステアリドン酸(SDA)が含まれる。GLAおよび他の重要な長鎖PUFAであるアラキドン酸(ARA)は、共に糸状菌に見出される。ARAは、肝臓および副腎を含む動物組織から精製することができる。ミード酸は、必須脂肪酸が不足した動物において蓄積される。

【0005】

DHAについては、供給源として種々の海洋生物を含む市販の製品に多数存在し、油は、寒流に生息する魚類および卵黄画分から得られる。ARAについては、*Mortierella*属、*Entomophthora*属、*Phytium*属、および*Porphyridium*属を含む微生物を、市販の製品として使用することができる。SDAの市販の供給源には、*Trichodesma*属および*Echium*属が含まれる。GLAの市販の供給源には、サクラソウ、ルリヂサ、およびクロフサスグリが含まれる。しかし、天然の供給源由来のPUFAの商業生産に関連していくつかの不利益な点がある。動物および植物などの天然のPUFA源は、油の成分が非常に不均質でありがちである。従って、これらの供給源から得た油は、1つまたは複数の所望のPUFAのおよび1つまたは複数のPUFAが豊富な油の産生のためにかなり精製する必要がある。天然供給源はまた、利用にあたり調節不可能なばらつきがありがちである。魚類の貯蔵物は、天然の変動を受け、魚の乱獲によって枯渇し得る。魚油は不快な味と臭いを有し、所望の製品から商業的に分離することが不可能で、このような製品は食品補助食品として受け入れることができない。動物油、特に魚油は、環境汚染物質として蓄積し得る。動物および植物供給源からの生産は、天候および病気によってばらつきを生じ得る。代替油生産作物の産生に利用可能な耕作地は、人口の一定の増加およびそれに付随する残された耕作可能な土地での食物生産の必要性による競争によって制約されやすい。ルリヂサなどのPUFAを産生する作物は、商業的な栽培に適用されず、単一栽培では十分に機能することができない。従って、このような作物の生長は、商業的な競争力が無く、より適切で、より良好に確立される作物が生長し得る。*Mortierella*などの生物の大量発酵はまた、高価である。天然の動物組織はARAの含有量が低く、処理が困難である。*Porphyridium*および*Mortierella*などの微生物は、商業的規模での培養が困難である。

【0006】

PUFAを含む栄養補助食品および薬学的組成物は、PUFA源の欠点を残したままであり得る。魚油カプセルなどの補助食品は、特に望ましい成分を低レベ

ルでしか含むことができないので、大量の投薬量を必要とする。高い投薬量により、高いレベルの不純物を含む望ましくない成分を摂取することになる。過剰な添加により、内因性の生合成経路が抑制されて、*in vivo*での種々の脂質画分中の必要な他の脂肪酸との競争が起こり、望ましくない結果を招くので、脂肪酸補助食品提供には注意を払わなければならない。例えば、高 ω 3脂肪酸食品を摂取しているエスキモーは、ますます出血する傾向にある（米国特許第4, 874, 603号）。補助食品の不快感および臭いは、このような投薬計画には望ましくなく、患者が服薬遵守できない。

【0007】

PUFA生合成には多数の酵素が関与する。リノレン酸(LA、18:2、 Δ 9、12)は、 Δ 12-不飽和化酵素によってオレイン酸(18:1、 Δ 9)から産生される。GLA(18:3、 Δ 6、9、12)は、 Δ 6-不飽和化酵素によってリノレン酸(LA、18:2、 Δ 6、9、12)から産生される。DGLA(20:3、 Δ 8、11、14)からのARA(20:4、 Δ 5、8、14)産生は、 Δ 5-不飽和化酵素によって触媒される。しかし、動物は、 Δ 9位で不飽和化することができないので、オレイン酸(18:1、 Δ 9)をリノレン酸(18:2、 Δ 9、12)に変換することができない。同様に、 α リノレン酸(ALA、18:3、 Δ 9、12、15)は、哺乳動物が生合成することができない。真菌類および植物を含む他の真核生物は、 Δ 12位および Δ 15位で不飽和化する酵素を有する。従って、動物の主要な多価不飽和脂肪酸は、食事および/またはリノレン酸(18:2、 Δ 9、12)または ω -リノレン酸(18:3、 Δ 9、12、15)の不飽和化および鎖長延長のいずれか由来である。

【0008】

多価不飽和脂肪酸は、栄養的、薬学的、産業的、および他の目的に有用であると考えられている。天然供給源および化学合成由来の多価不飽和脂肪酸の供給が増加しているが、商業的なニーズには不十分である。従って、これらの脂肪酸を天然に産生する種由来のPUFA生合成に関与する遺伝物質の獲得および単離された物質のみまたはPUFAの商業的量の産生が可能になるように操作することができる異種系との組み合わせの発現を得ることは興味深い。

【0009】

発明の要旨

植物および植物細胞の多価不飽和長鎖脂肪酸の調製用の新規の組成物および方法を提供する。本方法には、宿主植物細胞中で機能的な発現カセットで形質転換された目的の宿主植物細胞の成長が含まれ、この発現カセットは、PUFA産生を調整することができる不飽和化酵素のポリペプチドをコードするDNA配列を読み枠で連結した転写および翻訳開始調節領域を含む。不飽和化酵素のポリペプチドの発現により、PUFA生合成に関与する酵素の濃度変化の結果としての宿主植物細胞のPUFAプロフィールが変化する。植物組織および／または植物部分（葉、根、果実、および種子など）中でのPUFA産生の選択的調節は特に興味深い。本発明は、例えば、DHA、ミード酸、EPA、ARA、DGLA、ステアリドン酸、GLA、および他の脂肪酸の大量生産ならびに食用植物組織および／または植物部分の脂肪酸プロフィールの改変の用途がある。

【0010】

図面の簡単な説明

図1は、ミード酸（20：3、 Δ 5、8、11）、アラキドン酸（20：4、 Δ 5、8、11、14）、およびステアリドン酸（18：4、 Δ 6、9、12、15）の、藻類、Mortierellaおよびヒトを含む種々の生物由来のバルミチン酸（C₁₆）からの可能な生合成経路を示す図である。これらのPUFAは、ヒトおよび他の動物に重要な他の分子（プロスタサイクリン、ロイコトリエン、およびプロスタグランジンを含み、そのうちのいくつかを示した）の前駆体として作用し得る。

【0011】

図2は、ARAに加えて、種々の生物からさらに編成されたタキソレイン酸およびピノレイン酸を含むPUFAの可能な生合成経路を示す図である。

【0012】

好ましい実施形態の説明

本発明の完全な理解を確実にするために、以下の定義を用いる。

【0013】

Δ5-不飽和化酵素：Δ5-不飽和化酵素は、脂肪酸分子のカルボキシ末端から5つ目と6つ目の間の炭素に二重結合を導入する酵素である。

【0014】

Δ6-不飽和化酵素：Δ6-不飽和化酵素は、脂肪酸分子のカルボキシ末端から6つ目と7つ目の間の炭素に二重結合を導入する酵素である。

【0015】

Δ9-不飽和化酵素：Δ9-不飽和化酵素は、脂肪酸分子のカルボキシ末端から9つ目と10個目の間の炭素に二重結合を導入する酵素である。

【0016】

Δ12-不飽和化酵素：Δ12-不飽和化酵素は、脂肪酸分子のカルボキシ末端から12個目と13個目の間の炭素に二重結合を導入する酵素である。

【0017】

脂肪酸：脂肪酸は、長鎖の炭水化物およびカルボキシ末端基を含む化合物のクラスである。脂肪酸には、以下が含まれる。

【0018】

【表1】

脂肪酸		
12:0	ラウリン酸	
16:0	パルミチン酸	
16:1	パルミトレイン酸	
18:0	ステアリン酸	
18:1	オレイン酸	$\Delta 9-18:1$
18:2 $\Delta 5,9$	ネイロレイン酸	$\Delta 5,9-18:2$
18:2 $\Delta 6,9$	6,9-オクタデカン二酸	$\Delta 6,9-18:2$
18:2	リノレン酸	$\Delta 9,12-18:2(LA)$
18:3 $\Delta 6,9,12$	γ -リノレン酸	$\Delta 6,9,12-18:2(GLA)$
18:3 $\Delta 5,9,12$	ヒポリノレン酸	$\Delta 5,9,12-18:3$
18:3	α -リノレン酸	$\Delta 6,12,15-18:3(ALA)$
18:4	ステアロトニン酸	$\Delta 6,9,12,15-18:4(SDA)$
20:0	アラキドン酸	
20:1	エイコセン酸	
20:2 $\Delta 8,11$		$\Delta 8,11$
20:3 $\Delta 5,8,11$	ミトノ酸	$\Delta 5,8,11$
22:0	ヘンノン酸	
22:1	エルカ酸	
22:2	トコサヘノン二酸	
20:4 $\gamma 6$	アラキドン酸	$\Delta 5,8,11,14-20:4(ARA)$
20:3 $\gamma 6$	$\gamma 6$ -エイコサトリエン酸ジヘキセノリノレン酸	$\Delta 8,11,14-20:3(DGLA)$
20:5 $\gamma 3$	エイコサペンタエン酸(チムノトン酸)	$\Delta 5,8,11,14,17-20:5(EPA)$
20:3 $\gamma 3$	$\gamma 3$ -エイコサトリエン酸	$\Delta 11,16,17-20:3$
20:4 $\gamma 3$	$\gamma 3$ -エイコサテトラエン酸	$\Delta 8,11,14,17-20:4$
22:5 $\gamma 3$	トコサヘンタエン酸	$\Delta 7,10,13,16,19-22:5(\gamma 3DPA)$
22:6 $\gamma 3$	トコサヘキサエン酸(セルホニン酸)	$\Delta 4,7,10,13,16,19-22:6(DHA)$
24:0	リクノセリン酸	

【0019】

これらの定義を考慮すると、本発明は、植物における脂肪酸産生に関する新規のDNA配列、およびDNA構築物に関する。植物細胞の多価不飽和長鎖脂肪酸成分の改変を可能にする方法および組成物を提供する。植物細胞を、植物細胞中の1つまたは複数のPUFAの量を増加させることができるポリペプチドをコードするDNAを含む発現カセットで形質転換する。望ましくは、宿主細胞のゲノムに発現カセットを組み込むための組み込み構築物を調製することができる。宿主細胞を、不飽和化酵素活性を有するポリペプチドをコードするセンスまたはアンチ

センスDNAを発現するように操作する。「不飽和化酵素」は、1つまたは複数の脂肪酸を不飽和化して目的の一不飽和脂肪酸または多価不飽和脂肪酸またはその前駆体を産生することができるポリペプチドが意図される。「ポリペプチド」は、長さまたは翻訳後の修飾（例えば、糖鎖形成またはリン酸化反応）に関係なくアミノ酸の任意の鎖を意味する。発現酵素用の基質を、宿主細胞によって作製するか外因的に供給することができる。

【0020】

宿主細胞中での発現を達成するために、形質転換DNAは、宿主細胞中で機能的な転写および翻訳開始および終止調節領域に機能的に連結する。発現すべき遺伝子を含む構築物は、宿主細胞のゲノムへに組込まれ得るか、宿主細胞中で自律的に複製され得る。タキソレン酸の産生では、一般的に使用される発現カセットは、特に、宿主細胞中でオレイン酸を産生するか取り上げることができる $\Delta 5$ —不飽和化酵素活性が得られるカセットを含む。 $\Delta 6$ 、9、18:2または他の $\omega 9$ 不飽和化脂肪酸の産生では、一般的に使用される発現カセットは、特に、宿主細胞中でオレイン酸を産生するか取り上げることができる $\Delta 6$ —不飽和化酵素活性が得られるカセットを含む。 $\Delta 12$ —不飽和化酵素活性を有する植物におけるオレイン酸、タキソレイン酸、または $\omega 9$ 不飽和脂肪酸の産生により、アンチセンス $\Delta 12$ 転写物用の発現カセットが得られるか、 $\Delta 12$ —不飽和化酵素遺伝子を破壊することが好ましい。リノレン酸(LA)の産生では、一般的に使用される発現カセットは、特に、宿主細胞中でオレイン酸を産生するか取り上げることができる $\Delta 12$ —不飽和化酵素活性が得られるカセットを含む。ALAの産生では、一般的に使用される発現カセットは、特に、宿主細胞中でLAを産生するか取り上げることができる $\Delta 15$ —または $\omega 3$ 不飽和化酵素活性が得られるカセットを含む。GLAまたはSDAの産生では、一般的に使用される発現カセットは、特に、宿主細胞中でLAまたはALAをそれぞれ産生するか取り上げることができる $\Delta 6$ —不飽和化酵素活性が得られるカセットを含む。ALAを産生することができる植物における $\omega 6$ 型不飽和脂肪酸(LAまたはGLAなど)の産生は、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 型不飽和化酵素の活性を阻害することが好ましい。つまり、これは、アンチセンス $\Delta 15$ または $\omega 3$ 転写物用の発現カセットが得られるか、

$\Delta 15$ または $\omega 3$ 不飽和化遺伝子を破壊することによって達成される。同様に、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素活性を有する植物における LA または ALA の産生により、アンチセンス $\Delta 6$ 転写物用の発現カセットが得られるか、 $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を破壊することが好ましい。DGLA を産生するか取り上げることができる宿主細胞における ARA の産生では、一般に使用される発現カセットは、D5-不飽和化酵素活性を提供する。ALA を産生することができる植物における $\omega 6$ 型不飽和脂肪酸 (ARA など) の産生により、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 型不飽和化酵素の活性を阻害することが好ましい。つまり、これは、アンチセンス $\Delta 15$ または $\omega 3$ 転写物用の発現カセットが得られるか、 $\Delta 15$ または $\omega 3$ 不飽和化遺伝子を破壊することによって達成される。

【0021】

脂肪酸のトランスジェニック植物の産生

PUFA のトランスジェニック植物産生は、魚類または植物などの天然の供給源から精製においていくつかの利点を付与する。組換え植物からの脂肪酸の産生により、宿主における新規の合成経路の獲得または望ましくない経路の抑制によって植物脂肪酸プロファイルを変化させ、それにより、所望の PUFA レベルの増加、その結合形態、および所望でない PUFA レベルの減少能力が得られる。トランスジェニック植物における脂肪酸の産生はまた、特定の組織および／または植物部分における不飽和化酵素発現が、これらの組織および／または部分における所望の PUFA レベルの顕著な増加が達成され、これらの組織からより経済的に回収することができることを意味する。例えば、所望の PUFA を種子中で発現することができる。種子油の単離法は十分に確立されている。所望の PUFA の精製用の供給源の提供に加えて、種子油の成分を、不飽和化酵素単独またはエロンガーゼなどの他の遺伝子との組み合わせの発現によって操作し、特定の PUFA プロファイルを有する種子油を濃縮形態で得ることができる。次いで、濃縮種子油を、動物のミルクおよび／または半合成ミルクに添加して乳児用ミルクとして使用することができる。成人および乳児共に栄養失調または罹患している場合、ヒトの授乳は不可能であるか望ましくない。

【0022】

P U F A の産生では、宿主細胞、基質の利用可能性、および所望の末端産物に依存して、いくつかのポリペプチド、特に不飽和化酵素が興味深く、これには、ステアリン酸のオレイン酸への変換、L A の G L A への変換、A L A の S D A への変換、オレイン酸の L A への変換、または L A の A L A への変換、オレイン酸のタキソリン酸への変換、L A のピノレン酸への変換、オレイン酸の 6, 9-アクタデカーエノン二酸への変換を触媒するポリペプチドが含まれ、これには $\Delta 6$ 、 $\Delta 9$ 、 $\Delta 5$ 、 $\Delta 12$ 、 $\Delta 15$ 、 $\Delta 5$ 、または $\omega 3$ 位で不飽和化する酵素が含まれる。不飽和化酵素活性を有する特異的なポリペプチドを選択するために考慮すべきことには、ポリペプチドの至適 p H、不飽和化酵素が速度制限酵素またはその成分であるかどうか、使用する不飽和化酵素が所望の多価不飽和脂肪酸の合成に必須であるかどうか、および／またはポリペプチドが必要とする共因子が含まれる。発現されたポリペプチドは、好ましくは、宿主細胞中のその位置の生化学的環境に適合するパラメーターを有する。例えば、ポリペプチドは、宿主細胞中で他の酵素と基質を競合させなければならないであろう。従って、問題のポリペプチドの K_m および比活性の分析は、所与の宿主細胞における P U F A 産生の改変のための所与のポリペプチドの安定性の同定について考慮される。従って、特定の条件下で利用されるポリペプチドは、意図される宿主細胞中に存在する条件下で機能することができるか、そうでなければ所望の P U F A の相対的な産生を改変することができる所望の特徴を有する不飽和化酵素活性を有する任意のポリペプチドであり得る。パルミチン酸 (C_{16}) からのアラキドン酸 (20:4、 $\Delta 5$ 、8、11、14) の合成の略図を図 1 に示す。この経路において重要な酵素は、D H- γ -リノレン酸 (D G L A、エイコサトリエン酸) を A R A に変換する $\Delta 5$ -不飽和化酵素である。 $\Delta 6$ -不飽和化酵素による α -リノレン酸 (A L A) のステアリドン酸への変換もまた示す。A R A に加えて、E P A および D H A を含む P U F A の産生を、図 2 に示す。ステアリン酸 (C_{18}) からのアラキドン酸 (20:4、 $\Delta 5$ 、8、11、14) の合成において重要な酵素は、リノレン酸を γ -リノレン酸に変換する $\Delta 6$ -不飽和化酵素である。 $\Delta 6$ -不飽和化酵素による α -リノレン酸 (A L A) のステアリドン酸への変換もまた示す。A R A の産生に使用した D N A 配列は、 $\Delta 5$ -不飽和化酵素活性を有するポリペ

プチドをコードする。特定の例として、これは、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性および任意選択的に、 $\Delta 15$ 転写産物に対するアンチセンス配列の産生が得られる転写カセットを有するポリペプチドの産生が得られる転写カセットと結合することができる。使用したカセットの組み合わせの選択は、宿主細胞のPUFAプロフィールに一部依存する。宿主細胞の $\Delta 5$ -不飽和化酵素活性が制限される一方で、 $\Delta 5$ -不飽和化酵素のみの過剰発現は、一般に、ARA産生を促進するのに十分である。

【0023】

不飽和化酵素活性を有するポリペプチド源

不飽和化酵素活性を有するポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチド源は、所望の多価不飽和脂肪酸を産生する生物である。例として、ARA産生能を有する微生物を、 $\Delta 5$ -不飽和化酵素の遺伝子供給源として使用することができる（GLAまたはSDAを $\Delta 6$ -不飽和化酵素遺伝子および／または $\Delta 12$ -不飽和化酵素遺伝子の供給源として使用することができる微生物）。このような微生物には、例えば、*Mortierella*属、*Conidiosporium*属、*Pythium*属、*Phytophthora*属、*Penicillium*属、*Porphyridium*属、*Coidosporium*属、*Mucor*属、*Fusarium*属、*Aspergillus*属、*Rhodotorula*属、および*Entomophthora*属に属する微生物が含まれる。*Porphyridium*属内で特に興味深いものは*Porphyridium cruentum*である。*Mortierella*属内で特に興味深いものは、*Mortierella elongata*、*Mortierella exigua*、*Mortierella hygrophila*、*Mortierella ramanniana*、var. *angulisporea*、および*Mortierella alpina*である。*Mucor*属内で特に興味深いものは、*Mucor circinelloides*および*Mucor javanicus*である。

【0024】

所望の不飽和化酵素をコードするDNAは、種々の方法で同定することができ

る。例として、所望の不飽和化酵素の供給源（例えば、*Mortierella* 由来のゲノムまたはcDNAライブラリー）は、DNA、RNA、または天然に存在しないヌクレオチドまたはその混合物から作製することができる検出可能な酵素合成または化学合成プローブでスクリーニングされる。プローブは、通常またはストリンジェンシー（厳密性）を減少させたハイブリッド形成用の公知の不飽和化酵素のDNAから酵素合成することができる。オリゴヌクレオチドプローブを使用して供給源をスクリーニングすることもでき、公知の不飽和化酵素の配列（公知の不飽和化酵素間で保存されている配列を含む）または所望の精製タンパク質から得られるペプチド配列に基づくこともできる。アミノ酸配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブを、遺伝コードの同義性を包囲するために縮重するか、供給源の生物の好ましいコドンに有利に偏ることができる。オリゴヌクレオチドを、公知または推測される供給源由来の逆転写されたmRNA由来のPCR用のプライマーとして使用することもできる。PCR産物は、全長cDNAであり得るか、PCR産物を使用してプローブを作製して所望の全長cDNAを得ることができる。あるいは、所望のタンパク質全体を配列決定し、ポリペプチドをコードするDNAの全合成を行うことができる。

【0025】

一旦所望のゲノムDNAまたはcDNAが単離されると、公知の方法で配列決定することができる。この方法を間違えて供すると、同一領域の複数の配列決定が日常的になり、さらに得られた推測配列（特に、反復ドメイン、二次構造、または異常な塩基組成（高GC塩基含有領域）を有する領域）を測定可能な比率で誤ることが予想されることが当該分野で認識されている。矛盾が起こった場合、再配列決定を行い、特別な方法を用いることができる。特別な方法には、以下を使用した配列決定条件の変更が含まれる：異なる温度、異なる酵素、高次構造を形成するオリゴヌクレオチドの能力を変更するタンパク質、ITPまたはメチル化dGTPなどのヌクレオチドの変更、異なるゲル組成（例えば、ホルムアミドの添加）、異なるプライマーまたは問題の領域から異なる距離に位置するプライマー、または一本鎖化DNAなどの異なる鋳型。mRNAの配列決定もまた使用することができる。

【0026】

大部分については、不飽和化酵素活性を有するポリペプチドのいくつかまたは全てのコード配列は、天然の供給源である。しかし、いくつかの状況下では、例えば、発現を促進させるために宿主の好ましいコドンを使用することによってコドンの全てまたは一部を改変することが望ましい。宿主の好ましいコドンを、目的の特定の宿主の種において最も大量に発現されるタンパク質の最も高い頻度のコドンから同定することができる。従って、不飽和化酵素活性を有するポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を合成することができる。全てまたは一部のDNAを合成して、転写されたmRNAに存在する2次構造の任意の不安定な配列または領域を取り除くこともできる。全てまたは一部のDNAを合成して、所望の宿主細胞中のより好ましい塩基組成に変化させることもできる。配列合成法および配列移動法は、共に文献中で十分に確立されている。in vitro 変異誘発および選択、部位特変異誘発、または他の手段を使用して天然に存在する不飽和化酵素遺伝子の変異を得て宿主細胞中で機能するためのより多くの所望の物理的および速度的パラメーター（より長い半減期、所望の多価不飽和脂肪酸の効率的な生産など）をin vivoで有する不飽和化酵素活性を有するポリペプチドを作製することができる。

【0027】

所望のDNAは、60%未満のA+T組成、好ましくは50%未満のA+T組成を有する。20塩基対の局在した規模のスライド領域（sliding window）では、75%を超えるA+T組成を有するcDNAの局在領域が存在しないことが好ましい。60%を超えるA+T組成を有するcDNAの局在領域が存在しないことが好ましく、55%を超えるA+T組成を有するcDNAの局在領域が存在しないことがより好ましい。

【0028】

Mortierella alpina 不飽和化酵素

Mortierella alpina の $\Delta 5$ -不飽和化酵素、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素、 $\Delta 12$ -不飽和化酵素、および $\Delta 15$ -不飽和化酵素が特に興味深い。*Mortierella alpina* の $\Delta 5$ -不飽和化酵素をコードする遺伝

子をトランスジェニック植物中で発現させてDGLAからのARA、LAからのピノオレイン酸、オレイン酸からのタキソレイン酸、および $\Delta 8$ 、 $11-20:2$ からのミード酸をより大量に合成させることができる。Mortierella alpinaの $\Delta 5$ -不飽和化酵素のDNAと実質的に同一で、Mortierella alpinaの $\Delta 5$ -不飽和化酵素のポリペプチドに実質的に同一な他のDNAも使用することができる。Mortierella alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素をコードする遺伝子をトランスジェニック植物または動物中で発現させてリノレン酸からのGLA、またはALAからのステアリドン酸(SDA)、またはオレイン酸からの6, 9-オクタデカン二酸をより大量に合成させることができる。Mortierella alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素のDNAと実質的に同一で、Mortierella alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素のポリペプチドに実質的に同一な他のDNAも使用することができる。

【0029】

Mortierella alpinaの $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードする遺伝子をトランスジェニック植物中で発現させてオレイン酸からのLAをより大量に合成させることができる。Mortierella alpinaの $\Delta 12$ -不飽和化酵素のDNAと実質的に同一で、Mortierella alpinaの $\Delta 12$ -不飽和化酵素のポリペプチドに実質的に同一なポリペプチドをコードする他のDNAも使用することができる。

【0030】

配列が実質的に同一であるとは、Mortierella alpinaの $\Delta 5$ -不飽和化酵素のアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列をコードする核酸配列と好ましくは、少なくとも60%、80%、90%、または95%の相同性の増加を示すアミノ酸配列または核酸配列が意図される。ポリペプチドでは、比較配列の長さは、一般に、少なくとも16アミノ酸、好ましくは少なくとも20アミノ酸、最も好ましくは35アミノ酸である。ヌクレオチドでは、比較配列の長さは、一般に、少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは少なくとも60ヌクレオチド、より好ましくは75ヌクレオチド、最も好ましくは110ヌクレオチドで

ある。典型的に、相同性は、配列分析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis software package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705; MEGAlign (DNAS tar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wisconsin 53715) および MacVector (Oxford Molecular Group, 2105 S. Bascom Avenue, Suite 200, Campbell, California 95008)) を用いて計算される。このようなソフトウェアは、種々の置換、欠失、および他の改変に対する割り当ての程度によって類似の配列を整合させる。典型的には、保存的置換には、以下の基の範囲内での置換が含まれる：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、およびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。置換は、疎水性または親水性の保存 (K y t e a n d D o o l i t t l e, J. Mol. Biol., 157, 105~132, 1982) または類似のポリペプチドの2次構造の推測 (C h o u a n d F a s m a n, Adv. Enzymol., 47, 45~148, 1978) に基づいて作製することもできる。

【0031】

不飽和化酵素の発現

一旦不飽和化酵素のポリペプチドをコードするDNAが得られると、宿主細胞中で複製することができるベクターを配置し、PCRまたは長期PCRなどの技術によって *in vitro* で増殖させる。複製されるベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルス、コスミドなどが含まれ得る。所望のベクターには、宿主中の目的の遺伝子の変異誘発または目的の遺伝子の発現に有用なベクターが含まれ得る。長鎖PCR技術により、可能な限り大量の構築物の *in vitro* 増殖を行うことができ、それにより発現シグナルの変異誘発または付加などの目

的の遺伝子の改変、および得られた構築物の増殖が、複製ベクターまたは宿主細胞を使用することなく *in vitro* で完全に起こり得る。

【0032】

不飽和化酵素のポリペプチドの発現では、機能的な転写および翻訳の開始および終止領域が、不飽和化酵素ポリペプチドをコードするDNAに機能的に連結される。転写および翻訳の開始および終止領域は、種々の非排他的な供給源（発現すべきDNA、所望の系で発現することができる公知または予測の遺伝子、発現ベクター、化学合成を含む）からまたは宿主中の内因性遺伝子座から誘導される。植物組織または植物の一部における発現は、一定の効率を示し、特に、組織または部分は、種、葉、果実、花、根などの容易に収穫されるものである。発現は、以下に記載の特異的調節配列を使用して植物のその位置に標的することができる：米国特許第5,463,174号、同第4,943,674号、同第5,106,739号、同第5,175,095号、同第5,420,034号、同第5,188,958号、同第5,589,739号。あるいは、発現したタンパク質は、宿主植物由来の液体化区分に直接または更なる改変によって組込むことができる産物を産生する酵素であり得る。本発明の場合、植物部分および／または植物組織に見出される不飽和化酵素の遺伝子またはアンチセンス不飽和化酵素の転写物の発現により、特定のPUFAまたはその誘導体のレベルを変化させることができる。Δ5-不飽和化酵素のポリペプチドコード領域は、領域自体によるかまたは他の遺伝子を用いて発現させて所望のPUFAを高い比率で含むかまたは人の母乳とより類似したPUFA組成を含む組織および／または植物部分を産生させる（Prietoら、PCT公開WO 95/24494）。終止領域は、開始領域が得られる遺伝子の3'領域または異なる遺伝子に由来し得る。多数の終止領域が公知であり、同一または異なる属および種由来の種々の宿主で満足できることが見出された。終止領域は、通常、任意の特定の特性によるよりも便利なものとして選択される。

【0033】

宿主細胞の選択は、トランスジェニック細胞の所望のPUFAプロフィールおよび宿主細胞の天然のプロフィールに一部影響を受ける。例として、オレイン酸

からのリノレン酸の産生では、使用するDNA配列は $\Delta 12$ -不飽和化酵素活性を有するポリペプチドをコードし、リノレン酸からのGLAの産生では、使用するDNA配列は $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性を有するポリペプチドをコードする。 $\Delta 12$ -不飽和化酵素活性を発現し、 $\Delta 15$ -不飽和化酵素活性を欠くかまたは欠失した宿主細胞の使用は、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素のみの過剰発現が得られる発現カセットとともに使用することができ、これは一般にトランスジェニック細胞におけるGLA産生の促進に十分である。宿主細胞が $\Delta 9$ -不飽和化酵素活性を発現する場合、 $\Delta 12$ -および $\Delta 6$ -不飽和化酵素の発現は、GLA産生を促進することができる。特に、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素活性の発現が $\Delta 12$ -不飽和化酵素活性の発現と連結された場合、宿主細胞が天然にあるいは変異して低い $\Delta 15$ -不飽和化酵素活性を有していることが望ましい。あるいは、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素の宿主細胞が、天然にあるいは変異して高い $\Delta 12$ -不飽和化酵素活性を有しうる。

【0034】

宿主細胞中での発現は、一過性または安定な様式で達成され得る。一過性発現は、宿主細胞中で機能的な発現シグナルを含むが、構築物が宿主細胞中で複製されず殆んど構築物が組込まれていないか、または宿主細胞が増幅されていない場合に起こり得る。一過性発現はまた、誘導系の基本的な発現レベルがしばしば低いが、目的の遺伝子に機能的に連結された調節プロモーターの活性の誘導によって達成され得る。宿主ゲノムに組込むことができるかまたは宿主細胞中に自律的に複製する構築物の移入によって、安定な発現を達成することができる。目的の遺伝子の安定な発現は、位置付けられた選択マーカーの使用または発現構築物でのトランスフェクト、その後マーカーを発現する細胞の選択によって選択することができる。安定な発現が組込みに起因する場合、構築物の組み込みは、宿主ゲノム内で無作為に起こるか、宿主遺伝子座を用いた組換えの標的に十分な宿主ゲノムと相同性を有する領域を含む構築物の使用によって標的することができる。構築物が内因性遺伝子座に標的される場合、全てまたはいくつかの転写および翻訳調節領域は、内因性遺伝子座によって得ることができる。

【0035】

植物供給源中の不飽和化酵素のペプチド発現の増加を望む場合、いくつかの方法を使用することができる。不飽和化酵素のポリペプチドをコードする更なる遺伝子を、宿主生物に組込むことができる。天然の不飽和化酵素の遺伝子座由来の発現を、相同的組換え（例えば、発現の増加を引き起こすような宿主細胞の強力なプロモーターの挿入、宿主ゲノムからの情報の欠失によるmRNAまたはコードタンパク質のいずれか由来の不安定な配列の除去、またはmRNAへの安定化配列の付加（米国特許第4,910,141号および同第5,500,365号を参照のこと））によって増加させることもできる。

【0036】

1つを超える異なる遺伝子、適切な調節領域の発現を所望する場合、移入遺伝子を複製ベクターの使用または宿主ゲノムへの組込みによって宿主細胞中で増殖させることができる。2つまたはそれ以上の遺伝子を異なる複製ベクターから発現させる場合、ベクターが異なる複製手段を有することが望ましい。組込まれているかそうでない各移入構築物は、異なる選択手段を有し、かつ安定な発現を維持し構築物間のエレメントの再組み合わせを防止するために他の構築物との相同性を欠くべきである。調節領域の賢明な選択、移入された構築物の増殖の選択手段または選択方法は、全ての移入された遺伝子が所望の産物の合成を得るために必要とされるレベルで発現されるように経験的に決定することができる。

【0037】

目的の遺伝子を含む構築物を、標準的な技術によって宿主細胞に組込むことができる。これらの技術には、トランスフェクション、感染、ボリスティックインパクト（*bolistic impact*）、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、スクラッピング（*scraping*）、または目的の遺伝子を宿主細胞に移入する他の任意の方法（米国特許第4,743,548号、同第4,795,855号、同第5,068,193号、同第5,188,958号、同第5,463,174号、同第5,565,346号、および同第5,565,347号を参照のこと）が含まれる。便宜上、本明細書中でDNA配列または構築物を取り上げるための任意の方法によって操作されている宿主細胞を「形質転換された」または「組換え」と呼ぶ。本発明の宿主は、発現構築物の少な

くとも1つのコピーを有し、かつ遺伝子がゲノムに組込まれるか、複製されるか、複数のコピー数を有する染色体外エレメント上に存在するかどうかによって2つまたはそれ以上のコピーを有することができる。

【0038】

形質転換宿主細胞は、移入された構築物上に含まれるマーカーの選択によって同定することができる。あるいは、多数の形質転換技術で宿主細胞に多くのDNAを移入するように、別のマーカー構築物を、所望の構築物に移入することができる。典型的には、形質転換宿主は、選択培地でのその成長能力について選択される。選択培地は、抗生物質を組込むか、栄養または成長因子などの非形質転換宿主の増殖に必要な因子を欠損することができる。従って、移入マーカー遺伝子は、抗生物質耐性が付与されるか、必須の成長因子または酵素をコードし、形質転換宿主細胞中で発現した場合、選択培地で増殖することができる。望ましくは、カナマイシンおよびアミノグリコシド剤G418耐性が興味深い（米国特許第5,034,322号を参照のこと）。発現したマーカータンパク質を直接的または間接的に検出することができる場合、形質転換宿主の選択も行うことができる。マーカータンパク質は、単独または別のタンパク質との融合体として発現され得る。マーカータンパク質をその酵素活性によって検出することができる。例えば、 β ガラクトシダーゼは、基質X-galを有色産物に変換することができる、ルシフェラーゼは、ルシフェリンを発光産物に変換することができる。マーカータンパク質は、その発光または特徴の改変によって検出することができる。例えば、青色の光をあてた場合、*Aequorea victoria*の緑色の蛍光タンパク質の発光を発する。抗体を使用して、例えば、目的のタンパク質上のマーカータンパク質または分子タグを検出することができる。マーカータンパク質または分子タグを発現する細胞を、例えば、視覚的、FACSなどの技術、または抗体を使用したパニングによって選択することができる。

【0039】

本発明の方法および組成物を使用して作製したPUFAを、遊離の脂肪酸またはアシルグリセロール、リン脂質、硫脂質、または糖脂質などの複合形態で宿主植物組織および／または植物部分に見出されるか、当該分野で周知の種々の手段

によって宿主細胞から抽出することができる。このような方法には、有機溶媒での抽出、超音波処理、例えば二酸化炭素を用いた超臨界抽出法、プレスなどの物理的手段、またはその組み合わせが含まれる。ヘキサンまたはメタノールおよびクロロホルムでの抽出が特に興味深い。所望ならば、水相を酸性にして負電荷部分をプロトン化することにより、所望の産物の有機相への分配を増大させることができる。抽出後、有機溶媒を、窒素下での蒸発によって取り除くことができる。複合形態で単離された場合、産物を酵素的または化学的に切断して目的の遊離脂肪酸または少量の複合体を放出させ、その後更なる操作に供して所望の最終産物を作製することができる。望ましくは、脂肪酸の複合形態を、水酸化カリウムで切断する。

【0040】

驚いたことに、以下の実施例でより完全に示すように、*Mortierella* の $\Delta 6$ -不飽和化酵素の発現により、宿主細胞の種子組織から抽出された油中にステアリオドン酸が産生される。さらに、別の不飽和化酵素を有する $\Delta 6$ -不飽和化酵素は、種子油中のSDAの産生を促進した。

【0041】

従って、本発明は、宿主細胞中のステアリオドン酸(C18:4)の産生法を提供する。本方法により、約0.3重量%~少なくとも約30重量%、好ましくは約5重量%~少なくとも約25重量%、より好ましくは約7重量%~少なくとも約25重量%の範囲での宿主細胞中でのSDAの産生が可能である。好ましくは、SDAは、本明細書中に記載の1つまたは複数の発現構築物を含む宿主植物の種子油中で産生される。

【0042】

さらに、本発明は、ステアリオドン酸を含む新規の植物源を提供する。種子油は、約0.3重量%~少なくとも約30重量%、好ましくは約5重量%~少なくとも約25重量%、より好ましくは約7重量%~少なくとも約25重量%の範囲でのSDAの量を含む。

【0043】

脂肪酸の精製

更なる精製が必要な場合、標準的な方法を使用することができる。このような方法には、抽出、尿素処理、分別結晶、HPLC、分留、シリカゲルクロマトグラフィー、高速遠心分離、蒸留、またはこれらの技術の組み合わせが含まれる。反応基（酸またはアルキル基など）の保護を、周知の技術（例えば、アルキル化またはヨウ素化）によって任意の段階で行うことができる。使用した方法には、メチルエステルを産生する脂肪酸のメチル化が含まれる。同様に、保護基を任意の段階で取り除くことができる。所望ならば、ARA、DHA、およびEPAを含む画分の精製を、尿素処理および／または分留によって行う。

【0044】

脂肪酸の用途

本発明の脂肪酸の用途はいくつかある。本発明のDNAに基づくプローブは、関連する分子の単離法および不飽和化酵素を発現する生物を検出するための方法における用途があり得る。プローブとして使用する場合、DNAまたはオリゴヌクレオチドが検出される必要がある。これは、通常、例えば、修飾残基の組込みを介する内部部位、5'末端、または3'末端のいずれかに標識を結合することによって達成される。このようなラベルは直接検出することができ、検出可能に標識された第2の分子に結合することができるか、非標識の第2の分子および検出可能に標識された第3の分子に結合することができる。この処理はバックグラウンドシグナルが許容不可能なレベルではなく満足に検出可能なシグナルを達成することができるほど実際的である限り、延長することができる。2次、3次、または架橋系には、標識または他の抗体を含む任意の他の分子に指向する抗体の使用が含まれるか、互いに結合する任意の他の分子（例えば、ビオチン-スト렙トアビジン／アビジン系）を含み得る。典型的には、検出可能な標識には、放射性同位元素、化学的または酵素的に発光または偏光する分子、検出可能な反応性産物を産生する酵素、磁性分子、発光分子、または結合によってその蛍光または発光特性が変化する分子が含まれる。例として、標識法は、米国特許第5,011,770号に見出すことができる。あるいは、標的分子の結合を、等温滴定量熱分析を介して標的化するためのプローブの結合に対する加熱溶液の変化の測定、またはBIAcoreシステムを用いて行うことができるので表面上のプロ

ープまたは標的の被覆および標的またはプローブの結合によって生成した表面からの光の散乱の変化の検出によって直接検出することができる。

【0045】

本発明は、以下に記載の非限定的な実施例を参照してより理解される。

【0046】

実施例

実施例1

C. elegans 由来の ω 3不飽和化酵素のトランスジェニック植物中での発現。

Brassica napus の $\Delta 15/\omega-3$ 活性は、*C. elegans* 由来の $\omega-3$ 不飽和化酵素の発現によって増加させることができる。*fat-1* cDNAクローン (Genbank accession L41807、Spsychalla, J. P.、Kinney, A. J. およびBrowse, J.、1997、P. N. A. S.、94、1142~1147) を、Washington State UniversityのJohn Browseから得た。*fat-1* cDNAを、以下のプライマーを使用してクローニング部位を移入するためにPCRによって改変した。

【0047】

Fat-1 正方向：

5' -CUACUACUACUACTGCAGACAATGGTCGCTCAT
TCCTCAGA-3'

Fat-1 逆方向：

5' -CAUCAUCAUCAUGCGGCCGCTTACTTGGCCTTG
CCTT-3'

これらのプライマーにより、5' 末端および3' 末端それぞれにPst IおよびNot I部位が加わった全コード領域の複製が可能になる。PCR産物を、CloneAmp系 (GIBCOBRL) を用いてpAMP1 (GIBCOBRL) にサブクローン化してpCGN5562を作製した。配列を、PCRによって移入に変化が無いことを確認するために両鎖の配列決定によって評価した。

【0048】

fat-1 Genbank配列に対するpCGN5562由来の*fat-1*コード領域に塩基対の相違が1つ認められた。*fat-1*配列の705位のCが、pCGN5562のAに変化していた。これにより、GACコドンのGAAコドンへの変化が生じ、*fat-1*の231位のAsp残基がGlu残基に変化していた。*fat-1*鑄型を用いた2つの独立したPCR反応産物に同一の変化が認められたので、ヌクレオチドのPCRでの組み込みの失敗ではなさそうであった。種子特異的発現については、*Fat-1*コード領域を、pCGN5562から切り出してPst I/Not Iフラグメントとし、バイナリーベクターpCGN8623のPst I/Not I部位の間に挿入してpCGN5563を作製した。pCGN5563は、*Agrobacterium*媒介形質転換を介して*Brassica napus*に移入することができる。

【0049】

pCGN8623の構築

ナピン (*napin*) プロモーターカセットpCGN7770のポリリンカー領域を、以下のオリゴヌクレオチドの連結によって置換した。

【0050】

5' - TCGACCTGCAGGAAGCTTGCGGCCGCGGATCC
- 3'

5' - TCGAGGATCCGCGGCCGCAAGCTTCCTGCAGG
- 3'。

これらのオリゴヌクレオチドを、Sal I/Xho I消化pCGN7770に連結してpCGN8619を作製した。これらのオリゴはBamHI、Not I、HindIII、およびPst I制限部位をコードする。pCGN8619は、Pst I部位がナピン5'調節領域に最も近づくように配向したオリゴを含む。ナピン5'調節領域、ポリリンカー、およびナピン3'領域を含むフラグメントを、Asp718Iでの消化によってpCGN8619から除去した。フラグメントを、クレノウフラグメントを用いた5'オーバーハングに充填することによって平滑末端化し、その後Asp18IおよびHindIIIで消化したpCG

N5139に連結し、クレノウフラグメントを用いたオーバーハングへの充填によって平滑末端化した。ナピンプロモーターがpCGN5139の平滑末端化A s p 7 1 8 I 部位に最も近づき、かつナピン3' が平滑末端化H i n d I I I 部位に最も近づくように配向させたインサートを含むプラスミドを、配列分析に供してインサートの配向およびクローニング接合部の完全性を確認した。得られたプラスミドを、pCGN8623と呼ぶ。

【0051】

B r a s s i c a に高レベルのステアリドン酸を産生させるために、C. e l e g a n s の ω -3不飽和化酵素を、M o r t i e r e l l a a l p i n a 由来の Δ 6-不飽和化酵素および Δ 12-不飽和化酵素と組み合わせることができる。pCGN5563形質転換植物を、以下に記載の Δ 6-不飽和化酵素および Δ 12-不飽和化酵素を発現するpCGN5544形質転換植物と交配することができる。

【0052】

得られたF1種子を、ステアリドン酸含有量について分析し、選択したF1植物を、自家受粉させてF2種子を作製するか、ジハプロイド(d i h a p l o i d) 産生用のドナーとして使用するか、さらに交配することができる。

【0053】

f a t - 1 c D N A と M. a l p i n a の Δ 6-不飽和化酵素および Δ 12-不飽和化酵素とを組み合わせる別法は、形質転換用の1つのT-DNAでそれらを組み合わせることである。pCGN5562由来のf a t - 1 コード領域を切断してP s t I / N o t I フラグメントとし、P s t I / N o t I 消化pCGN8619に挿入することができる。ナピン5' 調節領域、f a t - 1 コード領域、およびナピン3' 調節領域からなる転写単位を切断してS s e 8 3 8 7 I フラグメントとし、A s e 8 3 8 7 I で切断したpCGN5544に挿入することができる。得られたプラスミドは、C. e l e g a n s の ω -3不飽和化酵素、M. a l p i n a の Δ 6-不飽和化酵素、およびM. a l p i n a の Δ 12-不飽和化酵素を含む3つのナピン転写単位(すべて、形質転換組織の選択用に使用した35S / n p t I I / t m l 転写単位と同一の方向に配向している)を含む

であろう。

【0054】

実施例2

トランスジェニックアブラナにおける $\Delta-15$ 不飽和化酵素の過剰発現

*Brassica napus*の $\Delta-15$ 不飽和化酵素活性を、 $\Delta-15$ 不飽和化酵素cDNAクローンの過剰発現によって増加させることができる。

【0055】

*B. napus*の $\Delta-15$ 不飽和化酵素のcDNAクローンを、*B. napus* cv. 212/86由来の第1の鎖cDNAのPCR複製によって得た。プライマーは、公開された配列 (Genbank # L01418 Arondelら、1992、Science、258、1353~1355) に基づいた。

【0056】

以下のプライマーを使用した：

Bnd15 正方向：

5' -CUACUACUACUAGAGCTCAGCGATGGTTGTGCT
ATGGAC-3'

Bnd15 逆方向：

5' -CAUCAUCAUGAATTCTTAATTGATTTTAGA
TTTG-3'

これらのプライマーにより、5' 末端および3' 末端にそれぞれSacIおよびEcoRI部位が加わった全コード領域の複製が可能になる。

【0057】

PCR産物を、CloneAmpシステム (GIBCOBRL) を用いてpAMP1 (GIBCOBRL) にサブクローン化し、pCGN5520を作製した。配列を、読み枠が完全なままであることを確認するために両鎖を配列決定によって評価した。種子特異的発現では、 $\Delta 15$ -不飽和化酵素のコード領域をpCGN5520から切断してBamHI/SalIフラグメントとし、pCGN7770のBglIIとXhoI部位との間に挿入してpCGN5557を作製した。ナピン5' 調節領域、*B. napus*の $\Delta 15$ -不飽和化酵素、およびナビ

ン3'調節領域を含むpCGN5557のPst Iフラグメントを、バイナリーベクターpCGN5138のPst I部位に挿入してpCGN5558を作製した。pCGN5558を、*Agrobacterium*媒介形質転換を介して*Brassica napus*に移入した。

【0058】

*Brassica*に高レベルのステアリドン酸を産生させるために、 $\Delta 15$ -不飽和化酵素を、*Mortierella alpina*由来の $\Delta 6$ -不飽和化酵素および $\Delta 12$ -不飽和化酵素と組み合わせることができる。pCGN5558形質転換植物を、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素および $\Delta 12$ -不飽和化酵素を発現するpCGN5544形質転換植物と交配した。得られたF1種子を、ステアリドン酸含有量について分析した。F1雑種種子のGC-FAME分析により、*Brassica*株の種子油におけるSDAの有意な蓄積が明らかとなった。約25%を超えるSDAレベル(18:4)をヘミ接合性株から得、表1に示す。選択したF1植物を、自家受粉してF2種子を作製するか、ジハプロイド(dihaploid)産生用のドナーとして使用するか、さらに交配した。

【0059】

【表2】

表 1

株 ID	16:0	18:0	18:1	18:2	18:2	18:2	18:3	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	6	1.34	2.97	9.58	9.58	9.58	52.79	34.76	18.03	25.21	0.7	0.56	0.16	0.41	0.03	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.45	0.86	10.42	9.06	9.06	9.06	49.08	25.68	23.4	23.45	0.5	0.84	0.55	0.49	0	0.03
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	5.8	2.36	12.5	11.13	11.13	11.13	47.47	18.86	28.61	17.35	1.01	0.86	0.3	0.85	0	0.07
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	3.65	0.66	14.26	14.97	14.97	14.97	50.94	23.3	27.64	13.22	0.43	0.88	0.23	0.48	0.04	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.86	2.42	18.74	14.23	14.23	14.23	46.22	23	23.22	10.67	0.89	0.92	0.18	0.7	0.02	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	6.57	1.07	16.79	14	14	14	48.98	32.88	16.09	10.24	0.52	0.94	0.22	0.39	0.02	0.01
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	5.85	2.09	8.81	19.12	19.12	19.12	50.89	12.03	38.86	9.09	1.39	0.78	0.45	1.23	0	0.04
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.69	2.04	17.46	21.1	21.1	21.1	43.38	24.28	19.1	8.5	0.73	0.96	0.37	0.56	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	5.43	1.69	16.59	22.2	22.2	22.2	44.4	16.57	27.83	6.34	0.9	1.03	0.32	0.81	0.03	0.05
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.28	1.34	18.83	27.24	27.24	27.24	40.54	20.91	19.63	5.03	0.73	0.88	0.27	0.7	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.47	1.38	21.43	26.89	26.89	26.89	39.04	18.78	20.26	4.06	0.73	0.91	0.41	0.48	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.77	1.12	18.4	31.1	31.1	31.1	38.51	19.62	18.88	3.52	0.64	0.8	0.21	0.7	0	0

(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.34	1.86	24.73	35.49	35.49	28.79	10.79	18	1.91	0.67	1.07	0.45	0.48	0	0.02
株 ID ★	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	18:3	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.71	1.75	20.72	34.68	34.68	34.01	4.65	29.36	1.62	0.71	0.89	0.1	0.63	0	0
(5558-SP30021-26 X 5544-LP30108-6-16-1-3)	4.3	0.8	40.79	14.34	14.34	37	36.88	0.12	0	0.43	1.47	0.29	0.29	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	6.61	1.5	22.09	11.23	11.23	39.9	25.84	14.06	16.25	0.75	0.75	0.27	0.57	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.64	1.89	22.73	15.12	15.12	44.48	32.21	12.27	8.78	0.73	0.89	0.23	0.43	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	5.51	1.45	24.82	17.79	17.79	41.84	27.46	14.38	6.45	0.59	0.82	0.23	0.39	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.06	1.67	26.39	16.93	16.93	42.64	32.65	9.99	6	0.64	0.96	0.24	0.41	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	5.24	1.44	22.2	20.02	20.02	42.76	28.69	14.07	5.98	0.67	0.79	0.26	0.45	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	5.34	2.2	22.68	18.6	18.6	43.14	31.45	11.69	5.5	0.82	0.87	0.25	0.53	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.98	2.9	25.23	21.21	21.21	38.78	24.6	14.18	4.98	1.02	1.04	0.24	0.57	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.94	1.77	28.92	20.89	20.89	37.02	21.71	15.32	4.96	0.64	1.09	0.3	0.43	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	5.12	1.24	27.7	19.02	19.02	40.2	31.05	9.16	4.76	0.48	0.77	0.23	0.35	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.16	1.52	28.59	21.99	21.99	36.85	23.33	13.33	4.55	0.6	0.98	0.27	0.41	0	0
(5558-SP30021-19 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.91	1.32	30.46	18.01	18.01	38.59	30.23	8.36	4.34	0.58	0.93	0.25	0.4	0	0

株 ID	16:0	18:0	18:1	18:2	18:2	18:3	18:3 C91215 -ALA	18:3 C6912 -GLA	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.66	1.52	29.52	20.52	20.52	36.61	20.09	16.52	5.63	0.67	1.12	0.14	0.52	0	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	5.09	1.81	25.81	21.54	21.54	38.2	22.52	15.68	4.92	0.75	0.96	0.12	0.57	0.02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.77	1.5	29.79	22.36	22.36	35.46	14.84	20.62	4.39	0.74	1.17	0.18	0.59	0.02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.71	1.45	32.18	23.86	23.86	32.32	17	15.32	3.92	0.63	1.12	0.15	0.5	0.02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.55	1.56	33.27	25.21	25.21	30.69	16.63	14.06	3.08	0.68	1.2	0.16	0.54	0.03	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.04	1.52	33.63	24.47	24.47	30.72	18.19	12.53	3.07	0.63	1.17	0.14	0.46	0	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.67	1.58	31.98	26.13	26.13	30.89	15.92	14.97	3.05	0.69	1.21	0.16	0.51	0	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.58	1.6	30.2	27.22	27.22	31.42	15.48	15.94	2.85	0.79	1.21	0.17	0.61	0.02	0.01
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	4.68	1.41	28.32	28	28	32.22	14.92	17.3	2.74	0.65	1.1	0.18	0.53	0.01	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.5	1.46	34.13	25.92	25.92	29.7	16.77	12.93	2.65	0.67	1.26	0.15	0.51	0.01	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.9	1.68	33.44	26.18	26.18	29.43	16.11	13.31	2.6	0.72	1.23	0.18	0.5	0.02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.82	1.71	31.84	27.78	27.78	29.49	15.28	14.2	2.59	0.73	1.19	0.16	0.55	0.02	0
(5558-SP30021-36 X 5544-LP30108-6-16-1-1)	3.6	1.78	29.45	28.14	28.14	31.64	12.83	18.81	2.57	0.76	1.21	0.17	0.58	0	0

B. napusの $\Delta 15$ -不飽和化酵素とM. alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素および $\Delta 12$ -不飽和化酵素とを組み合わせるための別法は、形質転換用の1つのT-DNAでそれらを組み合わせることである。ナピン5'調節領域、 $\Delta 15$ -不飽和化酵素コード領域、およびナピン3'調節領域からなる転写カセットを、pCGN5557から切断してSwa Iフラグメントとし、Swa I消化pCGN5544に挿入することができる。得られたプラスミドpCGN5561は、M. alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素、B. napusの $\Delta 15$ -不飽和化酵素、およびM. alpinaの $\Delta 12$ -不飽和化酵素を含む3つのナピン転写単位（すべて、形質転換組織の選択用に使用した35S/nptII/tm1転写単位と同一の方向に配向している）を含む。さらに、C. elegansの ω -3不飽和化酵素コード配列もまた、pCGN5544にクローン化して構築物pCGN5565を作製した。

【0061】

5561を含む植物のブールしたT2種子は、有意な量のSDA（18：4）を含む（表2に示す）。ブールした5561分離種子中に約7%を超えるレベルのSDAが得られる。さらに、5565Brassica株の種子から有意のレベルのSDAが得られた（表2に示す）。表2に示すように、構築物5561および5565では、約0.8重量%～約7重量%を超える範囲のSDAレベルを得ることができる。

【0062】

【表3】

表 2

株 ID	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:2	18:3	18:3	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	22:2
5561-6	4.46	0.21	3.5	22.85	0	18.33	18.71	21.61	7.79	1.04	0.76	0.19	0.47	0	0
5561-4	4.14	0.15	2.62	33.07	0	21.07	17.61	14.56	4.39	0.87	0.92	0.14	0.39	0	0.02
5561-2	4.26	0.15	2.21	30.42	0	22.02	21.06	12.88	4.25	0.89	0.98	0.2	0.51	0	0.02
5561-8	4.29	0.18	2	33.05	0	22.44	16.23	15.3	3.95	0.84	0.96	0.19	0.43	0	0.04
5561-3	3.95	0.12	2.04	32.93	0	24.48	17.42	13.33	3.27	0.79	0.94	0.21	0.4	0.03	0.03
5561-7	4.26	0.17	2.02	38.4	0	23.3	13.35	13.3	2.73	0.75	1.06	0.16	0.41	0	0
5561-13	4.38	0.18	1.86	58.94	0.65	13.98	7.1	8.26	1.88	0.77	1.27	0.29	0.35	0.03	0
5561-15	4.29	0.15	2.3	40.96	0	26.63	8.58	12.98	1.51	0.83	1.07	0.19	0.45	0	0.02
5561-1	4.25	0.15	1.91	47.41	0	24.46	5.56	12.81	1	0.72	1.14	0.15	0.39	0	0
5561-5	4.07	0.16	1.96	52.29	0	20.88	5.02	12.17	0.97	0.72	1.16	0.21	0.28	0	0.06
コントロール	3.89	0.21	1.65	58.48	0	22.44	0	11.03	0	0.6	1.15	0.16	0.27	0.01	0

表 2 続き

株 ID	16:0	18:0	18:1	18:2_C69	18:2-LA	18:3-GLA	18:3-ALA	18:4	20:0
5565-SP30021-7	4.03	1.93	41.24	0.43	14.46	21.39	6.62	7.38	0.68
5565-SP30021-12	3.95	2.46	40.19	0	30.35	7.3	10.92	2.57	0.7
5565-SP30021-9	4.03	1.82	35.76	0	33.49	8.63	11.58	2.54	0.51
5565-SP30021-3	3.86	1.8	32.3	0	35.57	11.3	10.05	2.37	0.61
5565-SP30021-1	3.98	1.92	59.99	1.84	11.24	8.07	7.46	2.32	0.76
5565-SP30021-8	4.67	1.72	38.95	0	30.38	8.99	10.83	2.25	0.52
5565-SP30021-10	4.03	1.43	47.04	0	26.96	5.97	11.1	1.35	0.52
5565-SP30021-6	3.87	1.77	46.73	0	28.79	5.31	10.4	0.79	0.56
コントロール	3.89	1.65	58.48	0	22.44	0	11.03	0	0.6

【0063】

実施例 3

葉中の植物発現における $\Delta 5$ -不飽和化酵素の発現

Ma 29は、配列相同性によって同定された推定M. plipinaの $\Delta 5$ -不飽和化酵素である。この実験は、Ma 29を発現する葉（ノーザン法で決定）が、外因的に適用されたDGL (20:3)のARA (20:4)への変換が可能であるかどうかを決定するために設計した。

【0064】

Ma 29不飽和化酵素のcDNAを、クローニング用に有用な制限部位を移入するためにPCRによって改変した。不飽和化酵素コード配列は、標準的なプロトコル（米国特許第5,424,200号および同第5,106,739号を参照のこと）に従って、Brassicaの葉（pCGN5525）における発現用の二重35Sプロモーターの調節下でd35カセットに挿入されている。pCGN5535を含むトランスジェニックBrassica植物を、標準的なプロトコル（米国特許第5,188,958号および米国特許第5,463,174号を参照のこと）に従って作製した。

【0065】

第1の実験では、以下の3つの植物を使用した：コントロールとしてLP004-1、トランスジェニックとして5525-23および5525-29。LP004は、低リノレン酸Brassica変種である。各葉を、以下の3つの処置のために選択した：水、GLA、またはDGLA。GLAおよびDGLAを、NuChek Prepからナトリウム塩として購入し、1mg/mlで水に溶解した。窒素下でアリコートに栓をし、 -70°C で保存した。葉の上側の表面に $50\mu\text{l}$ を滴下し、手袋をはめた指で表面全体に塗り広げることによって、葉を処理した。塗布した脂肪酸の任意の光酸化を最小にするために、塗布を、光サイクルの収量の約30分前に行った。処理の6日後、各処理から1枚の葉を収穫し、中央の葉脈から半分に切断した。半分を、組込まれなかった脂肪酸を取り除くために水で洗浄した。葉のサンプルを、一晚凍結乾燥し、ガスクロマトグラフィー（GC）によって脂肪酸組成を同定した。処理を表3に示す。

【0066】

【表4】

表 3
Ma29トランスジェニックBrassica植物由来の葉の脂肪酸分析

処理	SPL #	16:00 %	16:01 %	18:00 %	18:01 %	18:02 %	18:3g %	18:03 %	18:04 %	20:00 %	20:01 %
水	33	12.95	0.08	2.63	2.51	16.76	0	45.52	0	0.09	0
	34	13.00	0.09	2.67	2.56	16.86	0	44.59	0	0.15	0
	35	14.13	0.09	2.37	2.15	16.71	0	49.91	0	0.05	0.01
	36	13.92	0.08	2.32	2.07	16.16	0	50.25	0	0.05	0
	37	13.79	0.11	2.10	2.12	15.90	0.08	46.29	0	0.54	0.01
	38	12.80	0.09	1.94	2.08	14.54	0.11	45.61	0	0.49	0.01
GLA	39	12.10	0.09	2.37	2.10	14.85	1.63	43.66	0	0.53	0
	40	12.78	0.10	2.34	2.22	15.29	1.72	47.22	0	0.50	0.02
	41	13.71	0.07	2.68	2.16	15.92	2.12	46.55	0	0.09	0
	42	14.10	0.07	2.75	2.35	16.66	1.56	46.41	0	0.09	0.01
	43	13.62	0.09	2.22	1.94	14.68	2.42	46.69	0	0.51	0.01
	44	13.92	0.09	2.20	2.17	15.22	2.30	46.05	0	0.53	0.02
DGLA	45	12.45	0.14	2.30	2.28	15.65	0.07	44.62	0	0.12	0.01
	46	12.67	0.15	2.69	2.50	15.96	0.09	42.77	0	0.56	0.01
	47	12.56	0.23	3.40	1.98	13.57	0.03	45.52	0	0.51	0.01
	48	13.07	0.24	3.60	2.51	13.54	0.04	45.13	0	0.50	0.01
	49	13.26	0.07	2.81	2.34	16.04	0.04	43.89	0	0.59	0
	50	13.53	0.07	2.84	2.41	16.07	0.02	44.90	0	0.60	0.01

表 3 続き
Ma29トランスジェニックBrassica植物由来の葉の脂肪酸分析

処理	SPL #	20:02 %	20:03 %	20:04 %	20:05 %	22:00 %	22:01 %	22:02 %	22:03 %	22:06 %	24:0 %	24:1 %
水	33	0	0	0.29	0	0.01	0.09	16.26	0	0	0.38	0.18
	34	0.01	0	0.26	0	0.14	0.10	16.82	0.02	0.05	0.36	0.27
	35	0.01	0	0.25	0	0.12	0.06	11.29	0.04	0.05	0.29	0.25
	36	0	0.01	0.26	0	0.07	0.04	11.82	0.03	0.36	0.28	0.21
	37	0.02	0	0.21	0	0.18	0.08	15.87	0.06	0.20	0.30	0.17
	38	0.01	0	0.24	0	0.15	0.07	13.64	0.09	0.08	5.89	0.23
GLA	39	0.02	0.01	0.27	0	0.10	0.08	16.25	3.42	0.19	0.37	0.17
	40	0.01	0	0.27	0	0.10	0.10	14.74	0.05	0.10	0.36	0.14
	41	0	0	0.27	0	0.20	0.10	13.15	0.13	0.29	0.33	0.20
	42	0	0	0.28	0	0.11	0.11	12.60	0.02	0.24	0.38	0.13
	43	0.01	0	0.28	0	0.10	0.03	14.73	0.01	0.24	0.34	0.14
	44	0.02	0	0.26	0	0.13	0.07	14.43	0.05	0.16	0.33	0.17
DGLA	45	0.06	1.21	0.26	0	0.07	0.07	18.67	0.02	0.21	0.36	0.13
	46	0	1.94	0.27	0	0.11	0.09	17.97	0.09	0.39	0.41	0.11
	47	0.01	0.69	0.96	0	0.11	0.07	17.96	0	0.22	0.49	0.20
	48	0.01	0.70	0.74	0	0.14	0.09	17.14	0.05	0.32	0.52	0.10
	49	0	0.35	1.11	0	0.10	0.07	17.26	0.07	0.23	0.39	0.18
	50	0	0.20	0.87	0	0.21	0.07	15.73	0.04	0.15	0.37	0.18

【0067】

GLAで処理した葉は、1.56～2.4重量%のGLAを含んでいた。脂肪酸分析により、コントロールおよびトランスジェニックの葉の脂質組成は本質的

に同一であることが示された。DGLAで処理したコントロールの葉は、1.2～1.9重量%のDGLAおよびバックグラウンド量のARA(0.26～0.27重量%)を含んでいた。トランスジェニックの葉は、0.2～0.7%のDGLAしか含んでいなかったが、ARAレベルは増加(0.74～1.1重量%)しており、これは、これらの葉でDGLAがARAに変換されたことを示す。

【0068】

種子中での発現

本実験の目的は、種子特異的ナピンプロモーターを有する構築物が種子中で発現可能であるかどうかを決定することである。

【0069】

Ma29のcDNAを、以下のプライマーを用いて開始および終止コドンの上流および下流XhoIクローニング部位を移入するためにPCRによって移入した。

【0070】

Madxho正方向：

5' -CUACUACUACUACTCGAGCAAGATGGGAACGGA
CCAAGG

Madxho逆方向：

5' -CAUCAUCAUCAUCTCGAGCTACTCTTCCTTGGG
ACGGAG

PCR産物を、CloneAmp系(GIBCOBRL)を用いてpAMP1(GIBCOBRL)にサブクローン化してpCGN5562を作製し、Δ5-不飽和化酵素配列を両鎖の配列決定によって評価した。

【0071】

種子特異的発現のために、Ma29コード領域をpCGN5522から切断してXhoIフラグメントとし、ナピン発現カセットpCGN3223のSalI部位に挿入し、pCGN5528を作製した。ナピン5'調節配列、Ma29コード領域、およびナピン3'コード領域を含むpCGN5528のHindIIIフラグメントを、pCGN1557のHindIII部位に挿入してpCGN

5531を作製した。ナピン転写単位の2つのコピーを、縦列に挿入した。この縦列構築物は、遺伝子座あたりの不飽和化酵素をより高く発現させることができる。pCGN55331を、*Agrobacterium*媒介形質転換を介して *Brassica napus* cv. LP004に移入した。

【0072】

成熟T2の20個の種子プールの脂肪酸組成を、GCによって分析した。表2は、非形質転換LP004種子と比較した独立した形質転換株を用いて得た結果を示す。pCGN5531を含むトランスジェニック種子は、オレイン酸およびリノレン酸の溶出との比較に基づいて、コントロール種子には存在しない2つの脂肪酸（タキソレン酸（5，9-18：2）およびピノレン酸（5，9，12-18：3））を含む。これらは、オレイン酸およびリノレン酸の $\Delta 5$ -不飽和化酵素の予期した産物であろう。トランスジェニック種子では脂肪酸組成における他の相違は認められなかった。

【0073】

実施例4

トランスジェニック植物中の $\Delta 5$ -不飽和化脂肪酸の産生

pCGN5531（ $\Delta 5$ -不飽和化酵素）の構築およびT2種子プールの脂肪酸組成は、実施例3に記載されている。この実施例は、1世代を超える世代の種子を使用し、 $\Delta 5$ -不飽和化脂肪酸を最大にする方法を考察している。

【0074】

実施例3は、pCGN5531形質転換 *B. napus* cv. LP004植物のT2種子プールの脂肪酸組成を記載している。T2種子中の $\Delta 5$ -不飽和化脂肪酸の分離を調査するためおよびその後の世代を引き継ぐ各植物を同定するために、雑種の種子の分析を行った。種子を、水に浸した30℃の濾紙上で、暗所で一晚発芽させた。外側の使用をGC用に切り出して残りの幼植物を土壌に植えた。これらの分析のいくつかの結果を添付の表4に示す。 $\Delta 5$ 、9-18：2は、全脂肪酸の12%ほど蓄積され、 $\Delta 5$ 、9、12-18：3は脂肪酸の0.77%まで蓄積された。個々に選択したこれらおよび他のT2植物を、温室で生長させT3種子を産生させた。

【表 5】

4
表

	16:0	16:1	18:0	18:1	Δ5,9 18:2	18:2	Δ5,9,1218:3	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1	24:0
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
LP004 2710-4	3.86	0.15	3.05	69.1	0	18.51	0.01	1.65	1.09	1.40	0.03	0.63	0.05	0.42
5531-1	4.26	0.15	3.23	62.33	4.07	21.44	0.33	1.38	0.91	1.04	0.05	0.41	0.03	0.27
5531-2	3.78	0.14	3.37	66.18	4.57	17.31	0.27	1.30	1.03	1.18	0	0.47	0.01	0.30
5531-6	3.78	0.13	3.47	63.61	6.21	17.97	0.38	1.34	1.04	1.14	0.05	0.49	0.02	0.26
5531-10	3.96	0.17	3.28	63.82	5.41	18.58	0.32	1.43	0.98	1.11	0.02	0.50	0	0.31
5531-16	3.91	0.17	3.33	64.31	5.03	18.98	0.33	1.39	0.96	1.11	0	0.44	0	0
5531-28	3.81	0.13	2.58	62.64	5.36	20.95	0.45	1.39	0.83	1.15	0.01	0.36	0.05	0.21

【0076】

【表6】

表 4
pCGN5531-LP004 事象由来の選択された T2 雑種の脂肪酸分析

サイクルID	SPL NO	株ID	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 Δ5,9	18:2 Δ9,12	18:3 Δ5,9,12	18:3 Δ9,12,15
97XX1539	93	5531-LP004-6	0.03	0.07	3.92	0.17	3.5	61.32	12.22	15.36	0.77	1.36
97XX1539	29	5531-LP004-6	0.01	0.04	3.6	0.09	3.23	63.77	10.63	14.47	0	1.22
97XX1539	38	5531-LP004-6	0.01	0.05	3.71	0.09	3.02	65.13	10.57	13.98	0	1.06
97XX1539	41	5531-LP004-6	0.01	0.05	3.64	0.07	3.22	62.51	9.7	16.63	0	1.28
97XX1539	18	5531-LP004-6	0.02	0.06	3.69	0.09	3.36	63.79	9.63	15.29	0.63	1.15
97XX1539	85	5531-LP004-6	0.01	0.06	3.6	0.09	3.54	64.81	9.54	13.69	0.6	1.26
98GC0023	98	5531-LP004-23	0.01	0.05	3.5	0.09	3.12	64.97	9.92	13.62	0.55	1.25
98GC0023	32	5531-LP004-23	0.01	0.05	3.43	0.08	2.62	65.21	9.83	14.28	0.59	1.15
98GC0023	78	5531-LP004-23	0.01	0.05	3.45	0.07	2.78	64.97	9.34	14.69	0.58	1.17
98GC0023	86	5531-LP004-23	0.01	0.05	3.32	0.08	2.7	64.18	9.08	15.99	0.68	1.18
98GC0023	67	5531-LP004-23	0.01	0.04	3.49	0.08	3.03	64.14	8.78	15.95	0.62	1.08
98GC0023	52	5531-LP004-23	0.01	0.03	3.38	0.07	2.56	67.44	8.65	13.55	0.5	1.02

種子油中の $\Delta 5$ 、 $9-18:2$ 蓄積を最大にするために、pCGN5531構築物を、アブラナの種々の高オレイン酸変種に移入することができる。高オレイン酸は、 $\Delta 12$ -不飽和化酵素および $\Delta 15$ -不飽和化酵素、または他の必要な共因子の変異、共抑制 (co-suppression)、またはアンチセンス抑制によって得ることができる。

【0078】

アブラナにおける $\Delta 5$ 、 9 、 $12-18:3$ の蓄積を最大にするために、pCGN5531構築物を、アブラナの種々の高リノレン酸変種に移入することができる。これは、pCGN5531形質転換植物とpCGN5542-(*M. alpina*の $\Delta 12$ -不飽和化酵素)形質転換植物との交配によって達成することができる。あるいは、 $\Delta 5$ -不飽和化酵素および $\Delta 12$ -不飽和化酵素を、形質転換用の1つのT-DNAと組み合わせることができる。ナピン5'調節領域、*M. alpina*の $\Delta 12$ -不飽和化酵素、およびナピン3'調節領域からなる転写単位を、pCGN5541から切断してNot Iフラグメントとすることができる。Not I/Xba Iリンカーを連結することができ、得られたフラグメントをpCGN5531のXba I部位に挿入する。得られたプラスミドは、*M. alpina*の $\Delta 12$ -不飽和化酵素およびナピン/*M. alpina*の $\Delta 5$ -不飽和化酵素/ナピン単位の2つのコピーを含む3つのナピン転写単位(すべて、形質転換組織の選択用に使用した35S/npt II/tml転写単位と同一の方向に配向している)を含む。

【0079】

実施例5

*Brassica napus*中での*M. alpina*の $\Delta 6$ -不飽和化酵素の発現

*Mortierella alpina*由来の $\Delta 6$ -脂肪酸不飽和化酵素をコードする部分的cDNAクローン(Ma524)由来の核酸配列を、*M. alpina*のcDNAライブラリー由来のクローンのランダムシーケンスによって得た。Ma524のcDNAを、以下のプライマーを用いてクローニング部位を移入するためにPCRによって改変した。

【0080】

Ma524PCR-1

5' -CUACUACUACUATCTAGACTCGAGACCATGGCT
GCTGCTCCAGTGTG

Ma524PCR-2

5' -CAUCAUCAUCAUAGGCCTCGAGTTACTGCGCCT
TACCCAT

これらのプライマーにより、5' 末端にXbaI部位およびXhoI部位ならびに3' 末端にXhoI部位およびStuI部位が加わった全リード領域の複製が可能になる。PCR産物を、CloneAmp系(GIBCOBRL)を用いてpAMP1(GIBCOBRL)にサブクローン化してpCGN5535を作製し、 $\Delta 6$ -不飽和化酵素配列を、両鎖の配列決定によって評価した。

【0081】

pCGN5544の構築

植物宿主細胞中で*Mortierella alpina*の $\Delta 6$ -不飽和化酵素および*Mortierella alpina*の $\Delta 12$ -不飽和化酵素を発現させるために、植物発現構築物を調製した。調製した構築物を、植物種子中に優先的に発現される遺伝子由来の転写開始領域に利用した。*M. alpina*の $\Delta 6$ -不飽和化酵素および*M. alpina*の $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードするcDNA配列の単離は、PCT公開WO 98/46763およびWO 98/46764（その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

【0082】

種子特異的発現のために、Ma524コード領域をpCGN5535から切断してナピン発現カセットpCGN3223のXhoIフラグメントとしてSalI部位に挿入し、pCGN5536を作製した。ナピン5' 調節配列、Ma524コード領域、およびナピン3' コード領域を含むpCGN5536のNotIフラグメントを、pCGN1557のNotI部位に挿入してpCGN5538を作製した。

【0083】

M. alpinaの $\Delta 12$ -不飽和化酵素をコードする5542 cDNAを、以下のプライマーを用いてクローニング部位を移入するためにPCRによって改変した。

【0084】

Ma648 PCR: CUACUACUACUAGGATTCATGGCACCT
TCCCAACACT

Ma648 PCR: CAUCAUCAUCAUGGTACCTCGAGTTA
CTTCTTGAAAAAGAC

これらのプライマーにより、5'末端にBamHI部位ならびに3'末端にKpnI部位およびXhoI部位が加わった全コード領域の複製が可能になる。PCR産物を、CloneAmp系(Gibco-BRL)を用いてpAMP1(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)にサブクローン化してpCGN5540を作製し、 $\Delta 12$ -不飽和化酵素を、両鎖の配列決定によって評価した。

【0085】

種子の優先的発現構築物を、 $\Delta 12$ -不飽和化酵素cDNA配列用に調製した。Ma648コード領域を、pCGN5540から切り出してBamHI/XhoIフラグメントとし、ナピン発現カセットpCGN3223(米国特許第5,639,790号に記載)のBgiIIとXhoI部位との間に挿入してpCGN5542を作製した。

【0086】

同一のT-DNA由来のM. alpina $\Delta 6$ -不飽和化酵素および $\Delta 12$ -不飽和化酵素配列を発現させるために、以下の種子優先的発現系を構築した。

【0087】

ナピン5'転写開始領域、Ma524コード領域、およびナピン3'転写終止領域を含むpCGN5536のNotIフラグメントを、pCGN5542のNotI部位に挿入してpCGN5524を作製した。発現カセットは、Ma524、Ma648、およびnptIIマーカーの方向が同一であるような様式で配

向していた。

【0088】

種子特異的発現のために、Ma524コード領域をpCGN5535から切断してXhoIフラグメントとし、ナピン発現カセットpCGN3223のSalI部位に挿入してpCGN5536を作製した。ナピン5'転写開始領域、Ma524コード領域、およびナピン3'転写終止領域を含むpCGN5536のNotIフラグメントを、pCGN1557のNotI部位に挿入してpCGN5538を作製した。pCGN5538を、Agrobacterium媒介形質転換を介してBrassica napus cv. LP004に移入した。

【0089】

成熟したT2種子を、温室中の6つの独立した形質転換事象から収穫した。種子の脂肪酸組成を、GCによって分析した。表5は、コントロールLP004および6つの5538株の結果を示す。#8を除く全ての5538株がGLAを含む種子を産生した。これらの種子で分離されたGLAの存在は、T2自己受粉種子集団での予想と同じであった。GLAに加えて、M. alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素は、18:4（ステアリドン酸）および別の脂肪酸（ $\Delta 6$ 、9-18:2）を産生することができる。

【0090】

【表7】

表 5

Ma524トランスジェニックBrassica植物からの種子の脂肪酸分析

SPL		16:0	16:1	18:0	18:1	6,9,18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
#		%	%	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	LPO04-1	4.33	0.21	3.78	72.49	0	13.97	0	1.7	0	1.34	0.71	0.02	0.58	0.27
	-2	4.01	0.16	3.09	73.59	0	14.36	0.01	1.4	0	1.43	0.66	0.02	0.5	0.2
	-3	4.12	0.19	3.56	70.25	0	17.28	0	1.57	0	1.28	0.5	0.02	0.39	0.2
	-4	4.22	0.2	2.7	70.25	0	17.86	0	1.61	0	1.31	0.53	0.02	0.4	0.24
	-5	4.02	0.16	3.41	72.91	0	14.45	0.01	1.45	0	1.37	0.7	0.02	0.51	0.26
	-6	4.22	0.18	3.23	71.47	0	15.92	0.01	1.52	0	1.32	0.69	0.02	0.51	0.27
	-7	4.1	0.16	3.47	72.06	0	15.23	0	1.52	0	1.32	0.63	0.03	0.49	0.23
	-9	4.01	0.17	3.71	72.98	0	13.97	0.01	1.41	0	1.45	0.74	0.03	0.58	0.23
	-10	4.04	0.16	3.57	70.03	0	17.46	0	1.5	0	1.33	0.61	0.03	0.36	0.24
	5538-1-1	4.61	0.2	3.48	68.12	1.37	10.68	7.48	1.04	0.33	1.19	0.49	0.02	0.33	0.13
	-2	4.61	0.22	3.46	68.84	1.36	10.28	7.04	1.01	0.31	1.15	0.48	0.02	0.39	0
	-3	4.78	0.24	3.24	65.86	0	21.36	0	1.49	0	1.08	0.46	0.02	0.38	0.22
	-4	4.84	0.3	3.89	67.64	1.67	9.9	6.97	1.02	0.36	1.14	0.53	0.02	0.5	0.18
	-5	4.64	0.2	3.58	64.5	3.61	8.85	10.14	0.95	0.48	1.19	0.47	0.01	0.33	0.12
	-6	4.91	0.27	3.44	66.51	1.48	11.14	7.74	1.15	0.33	1.08	0.49	0.02	0.34	0.13
	-7	4.87	0.22	3.24	65.78	1.27	11.92	8.38	1.2	0	1.12	0.47	0.02	0.37	0.16
	-8	4.59	0.22	3.4	70.77	0	16.71	0	1.35	0	1.14	0.48	0.02	0.39	0.15
	-9	4.63	0.23	3.51	69.66	2.01	8.77	7.24	0.97	0	1.18	0.52	0.02	0.3	0.11
	-10	4.56	0.19	3.55	70.68	0	16.89	0	1.37	0	1.22	0.54	0.02	0.22	0.03
	5538-3-1	4.74	0.21	3.43	67.52	1.29	10.91	7.77	1.03	0.28	1.11	0.5	0.02	0.35	0.14
	-2	4.72	0.21	3.24	67.42	1.63	10.37	8.4	0.99	0	1.12	0.49	0.02	0.36	0.15

表 5

Ma524トランスジェニック Brassica 植物からの種子の脂肪酸分析

SPL		16:0	16:1	18:0	18:1	6,9 18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
#		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	-3	4.24	0.21	3.52	71.31	0	16.53	0	1.33	0	1.12	0.45	0.02	0.4	0.14
	-4	4.64	0.21	3.45	67.92	1.65	9.91	7.97	0.91	0.33	1.14	0.47	0.02	0.37	0.14
	-5	4.91	0.25	3.31	67.19	0	19.92	0.01	1.39	0	1.05	0.48	0.02	0.37	0.14
	-6	4.67	0.21	3.25	67.07	1.23	11.32	8.35	0.99	0	1.16	0.47	0.02	0.33	0.16
	-7	4.53	0.19	2.94	64.8	4.94	8.45	9.95	0.93	0.44	1.13	0.37	0.01	0.27	0.12
	-8	4.66	0.22	3.68	67.33	0.71	12	6.99	1.1	0.24	1.18	0.48	0.03	0.36	0.17
	-9	4.65	0.24	3.11	67.42	0.64	12.71	6.93	1.16	0.25	1.08	0.45	0.02	0.32	0.17
	-10	4.88	0.27	3.33	65.75	0.86	12.89	7.7	1.1	0.24	1.08	0.46	0.01	0.34	0.16
5538-4-1		4.65	0.24	3.8	62.41	0	24.68	0	1.6	0.01	0.99	0.45	0.02	0.33	0.13
	-2	5.37	0.31	3	57.98	0.38	18.04	10.5	1.41	0	0.99	0.48	0.02	0.3	0.19
	-3	4.61	0.22	3.07	63.62	0.3	16.46	7.67	1.2	0	1.18	0.45	0.02	0.29	0.14
	-4	4.39	0.19	2.93	65.97	0	22.36	0	1.45	0	1.17	0.41	0.03	0.32	0.15
	-5	5.22	0.29	3.85	62.1	2.35	10.25	11.39	0.93	0.41	1.04	0.6	0.02	0.47	0.17
	-6	4.66	0.18	2.85	66.79	0.5	13.03	7.66	0.97	0.22	1.28	0.42	0.02	0.31	0.14
	-7	4.85	0.26	3.03	57.43	0.26	28.04	0.01	2.59	0.01	1.13	0.56	0.02	0.4	0.23
	-8	5.43	0.28	2.94	54.8	1.84	13.79	15.67	1.36	0.53	1.1	0.55	0.02	0.35	0.19
	-9	4.88	0.24	3.32	62.3	0.58	14.86	9.04	1.34	0.29	1.13	0.52	0.02	0.37	0.19
	-10	4.53	0.2	2.73	64.2	0.07	24.15	0	1.52	0	1.09	0.39	0.02	0.27	0.17
5538-5-1		4.5	0.15	3.35	66.71	0.88	11.7	8.38	1.04	0.3	1.24	0.49	0.02	0.29	0.17
	-2	4.77	0.23	3.06	62.67	0.68	15.2	8.8	1.31	0.28	1.15	0.46	0.02	0.3	0.19
	-3	4.59	0.22	3.61	64.35	2.29	9.95	10.57	1.01	0.45	1.21	0.48	0.02	0.26	0.16

表 5

Ma524トランスジェニック Brassica 植物からの種子の脂肪酸分析

SPL		16:0	16:1	18:0	18:1	6:9 18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
#		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	-4	4.86	0.26	3.4	67.69	0.65	12.24	6.61	1.09	0.23	1.07	0.45	0.02	0.32	0.14
	-5	4.49	0.21	3.3	69.25	0.04	16.51	2.18	1.2	0	1.11	0.44	0.02	0.33	0.16
	-6	4.5	0.21	3.47	70.48	0.08	14.9	2.19	1.22	0	1.13	0.49	0.02	0.33	0.16
	-7	4.39	0.21	3.44	67.59	2.38	9.24	8.98	0.89	0	1.18	0.44	0.02	0.28	0.14
	-8	4.52	0.22	3.17	68.33	0.01	18.91	0.73	1.32	0.01	1.08	0.45	0.02	0.29	0.17
	-9	4.68	0.2	3.05	64.03	1.93	11.03	11.41	1.02	0.01	1.15	0.39	0.02	0.21	0.15
	-10	4.57	0.2	3.1	67.21	0.61	12.62	7.68	1.07	0.25	1.14	0.43	0.02	0.25	0.15
5538-8-1		4.95	0.26	3.14	64.04	0	23.38	0	1.54	0	0.99	0.42	0.02	0.38	0.17
	-2	4.91	0.26	3.71	62.33	0	23.97	0	1.77	0	0.95	0.53	0.02	0.42	0.19
	-3	4.73	0.25	4.04	63.83	0	22.36	0.01	1.73	0	1.05	0.55	0.02	0.45	0.16
	-4	5.1	0.35	3.8	60.45	0	24.45	0.01	2.13	0	1.07	0.65	0.03	0.53	0.24
	-5	4.98	0.3	3.91	62.48	0	23.44	0	1.77	0	1.01	0.51	0.01	0.43	0.21
	-6	4.62	0.21	3.99	66.14	0	20.38	0	1.48	0	1.15	0.53	0.02	0.48	0.19
	-7	4.64	0.22	3.55	64.6	0	22.65	0	1.38	0	1.09	0.45	0.02	0.41	0.19
	-8	5.65	0.38	3.18	56.6	0	30.83	0.02	0.02	0	0.98	0.55	0.03	0.39	0.26
	-9	8.53	0.63	6.9	51.76	0	26.01	0	0.01	0	1.41	1.21	0.07	0.96	0.33
	-10	5.52	0.4	3.97	57.92	0	28.95	0	0.02	0	0.95	0.52	0.02	0.41	0.16
5538-10-1		4.44	0.19	3.5	68.42	0	19.51	0	1.32	0	1.14	0.45	0.02	0.31	0.16
	-2	4.57	0.21	3.07	66.08	0	21.99	0.01	1.36	0	1.12	0.41	0.02	0.31	0.16
	-3	4.63	0.21	3.48	67.43	0	20.27	0.01	1.32	0	1.12	0.46	0.02	0.21	0.08
	-4	4.69	0.19	3.22	64.62	0	23.16	0	1.35	0	1.08	0.46	0.02	0.33	0.2

表 5

表 5															
Ma524トランスジェニックBrassica植物からの種子の脂肪酸分析															
SPL		16:0	16:1	18:0	18:1	6,9 18:2	18:2	18:3ga	18:3	18:4	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1
#		%	%	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	-5	4.58	0.2	3.4	68.75	0	20.17	0.01	0.02	0	1.1	0.45	0.02	0.34	0.17
	-8	4.55	0.21	0	73.55	0.05	14.91	2.76	1.21	0.07	1.24	0.51	0.02	0.19	0
	-9	4.58	0.21	3.28	66.19	0	21.55	0	1.35	0	1.12	0.43	0.02	0.33	0.16
	-10	4.52	0.2	3.4	68.37	0	19.33	0.01	1.3	0	1.13	0.46	0.02	0.35	0.18

【0091】

GLAを産生するトランスジェニックBrassica5544株と標準的な非形質転換アブラナ変種との交配を行った。5544株とQuantum、Ea

g l e、およびE b o n yとの交配を行った。

【0092】

F 1雑種の種子を、S D A含有量について分析し、選択した植物を生長させて自家受粉させ、F 2種子を作製した。このような交配由来の単一の種子および雑種の種子サンプルのG C - F A M E分析により、有意なレベルのS D Aの蓄積が明らかになった(表6)。5 5 4 4 - L P 1 0 8 - 6 - 1 6とアブラナ変種のE a g l eとの雑種種子分析により、約6. 3 % S D Aのレベルが得られた。5 5 4 4 - L P 1 0 8 - 1 2 - 1とアブラナ変種のE b o n yとの雑種由来の種子分析により、約7. 4 % S D AものS D Aレベルが得られた。

【0093】

【表8】

表 6

株 I D	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:2 C69	18:3 C6912	18:3 C91215	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	6.34	0.84	1.9	4.7	0	14.81	56.73	3.78	6.29	2.12	0.66	0.59	1.04
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	10.18	1.43	4.23	4.34	0	15.96	48.78	3.79	5.51	2.65	0.72	0.77	1.32
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	4.81	0.45	2.53	12.2	0	21.61	46.74	4.83	4.11	0.98	0.79	0.4	0.43
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	4.74	0.48	3.33	16.06	0	20.68	43.02	4.82	3.73	1.25	0.7	0.33	0.75
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	6.02	0.53	1.25	17.29	0	27.34	33.97	7.52	3.41	0.85	0.77	0.27	0.59
(SP30035-46 x 5544-LP30108-6-16)	3.68	0.13	1.99	19.75	0.09	22.75	39.98	5.76	3.41	0.8	0.87	0.27	0.44
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	8.92	0.96	1.64	14.61	0	18.69	36.98	7.44	7.43	1.01	0.49	0.49	0.95
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	9.02	0.89	1.88	10.69	0	16.73	43.39	6.8	6.76	1.05	0.57	0.75	1.07
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	7.76	0.59	1.86	8.15	0	16.04	52.24	4.65	5.3	1.04	0.59	0.69	0.83
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	9.21	0.87	2.23	17.44	0	18.77	36.87	6.79	5.05	0.84	0.64	0.31	0.71
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	5.76	0.31	1.6	20.38	0	24.36	29.94	10.9	4.41	0.69	0.78	0.23	0.48
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4.03	0.22	1.3	16.87	0	19.3	46.67	5.33	4.17	0.53	0.75	0.35	0.37
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4.66	0.29	4.47	18.09	0.05	19.07	41.92	5.06	3.47	1.13	0.73	0.35	0.57
(SP30052-7 x 5544-LP30108-12-1)	4.91	0.26	3.13	18.16	0	18.53	43.99	4.64	3.43	1.01	0.79	0.37	0.66

【0094】

实施例 6

アブラナ油中の $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ の産生

実施例5では、トランスジェニックアブラナの種子中でM. alpinaの $\Delta 6$ -不飽和化酵素を発現するように設計したpCGN5538の構築を記載した。実施例5で、表4は、6つの独立したトランスジェニック事象由来の単一の種子の分析例を示した。 $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ 脂肪酸に加えて、有意な量のGLAが産生された。

【0095】

全部で29の独立した低リノレン酸LP004品種のpCGN5538形質転換トランスジェニック植物を再生し、温室で生長させた。表7は、各事象由来のT2種子の20の種子プールの脂肪酸組成を示す。株のうち7つが、種子プールにおいて2%を超える $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ を含んでいた。後の世代を引き継ぐべき大量の $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ を有する植物を同定および選択するために、雑種種子分析を行った。種子を、水に浸した30℃の濾紙上で、暗所で一晚発芽させた。外側の使用をGC用に切り出して残りの幼植物を土壌に植えた。脂肪酸分析結果に基づいて、選択したT2植物を、温室で生長させてT3種子を産生させた。選択サイクルを繰り返した。T3種子のプールを $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ について分析し、T3雑種種子を切り出して分析し、そしてT3植物を温室で生長させてT4種子を産生させた。T4種子のプールを、脂肪酸組成物について分析した。表6は、元のトランスジェニック事象の一つである5538-LP004-25についての処理の結果をまとめたものである。従って、 $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ レベルは、3世代を通して維持されていた。

【0096】

生産することができる $\Delta 6$ 、 $9-18:2$ の量を最大にするために、pCGN5538構築物を、形質転換または交配によってアブラナの高オレイン酸変種に移入することができる。高オレイン酸変種は、 $\Delta 12$ 不飽和化酵素および $\Delta 15$ 不飽和化酵素の変異、共抑制、またはアンチセンス抑制または他の必要な共因子によって得ることができる。

【0097】

【表9】

表 7
pCGN5538T2種子の20個の種子の脂肪酸組成

SPL	5538-T2P04	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	Δ6,9	18:2	18:3	Δ9,12,15	18:4	20:0	20:1	20:2	22:0	22:2
#	事象	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
31		0.02	0.06	4.07	0.07	0	59.4	5.4	10.07	15.93	1.2	0.6	0.98	1.16	0.0	0.44	0.03
29		0.01	0.05	3.81	0.14	0	60.7	4.53	10.9	14.77	1.03	0.55	1.09	1.26	0.0	0.46	0.02
19		0.02	0.07	4.27	0.13	0	62.9	4.17	10.03	13.14	1.02	0.59	1.18	1.25	0.0	0.53	0.02
14		0	0	5.29	0.24	3.8	49.1	1.02	23.44	11.21	2.26	0.34	1.45	0.93	0.0	0.76	0
22		0.02	0.05	3.87	0.09	0	64.1	2.59	12.57	11.16	1.27	0.6	1.18	1.08	0.1	0.56	0
9		0.01	0.06	4.57	0.16	0	62.9	3.4	12.05	11.15	1.27	0.6	1.28	1.18	0.0	0.56	0.03
25		0.01	0.06	4.17	0.14	0	62.4	2.49	14.42	11.03	1.2	0.46	1.18	1.15	0.0	0.53	0.01
15		0.01	0.05	3.94	0.11	0	65.2	2.08	12.77	10.9	1.04	0.43	1.1	1.24	0.0	0.48	0.01
18		0	0.06	5.34	0.29	0	58.4	1.42	18.19	10.53	1.8	0.49	1.2	1	0.0	0.58	0.02
20		0.01	0.04	3.95	0.11	0	65.6	1.31	13.83	10.22	1.09	0.39	1.06	1.3	0.0	0.46	0.01
7		0.02	0.07	4.04	0.11	0	62.1	0.92	18.12	8.72	1.77	0.35	1.26	1.19	0.0	0.58	0
11		0.01	0.06	4.23	0.17	0	62.9	1.6	17.19	8.58	1.48	0.38	1.16	1.03	0.0	0.49	0.01
27		0.02	0	3.99	0.14	0	65.3	0.64	17.85	7.89	1.36	0.31	1.08	1.21	0.0	0	0
2		0.01	0.05	4.02	0.14	0	66.4	1.2	15.74	7.58	1.22	0.32	1.06	1.19	0.0	0.45	0
28		0.01	0.04	3.77	0.11	0	67.5	0.79	15.56	7.58	1.12	0.28	0.97	1.23	0.0	0.44	0
3		0.01	0.05	3.96	0.12	0	68.5	1.81	13.23	7.44	1.1	0.35	1.12	1.21	0.0	0.46	0.01
21		0.01	0.05	3.74	0.1	0	66.9	1.16	15.9	6.97	1.35	0.28	1.15	1.27	0.0	0.52	0
5		0.01	0.04	3.81	0.12	0	69.1	0.74	14.58	6.95	1.14	0.28	1.06	1.18	0.0	0.45	0
6		0	0	2.84	0	3.06	62.5	1.55	18.44	6.94	1.21	0.39	1.04	1.33	0.1	0	0
4		0.01	0.05	3.88	0.11	0	66.9	0.64	16.21	6.89	1.52	0.31	1.09	1.21	0.0	0.5	0

[illegible]

【 0 0 9 8 】

【表 10】

表 7

株 ID	T 2 プール		GLA	T 3 プール		GLA	T 3 選択		GLA	T 4 プール	
	△6.9 18.2	2.49		△6.9 18.2	△6.9 18.2		△6.9 18.2	△6.9 18.2		△6.9 18.2	△6.9 18.2
5538-LP004-25			11.03								△6.9 12 18.3
5538-LP004-25-3				9.1		11.92					
5538-LP004-25-3-31											
5538-LP004-25-3-30							13.61	7.82		11.02	9.41
5538-LP004-25-3-29							6.51	7.93		10.37	8.7
5538-LP004-25-3-28							13.35	11.23		9.42	10.5
5538-LP004-25-3-25							9.92	24.1		9.37	10.19
							5.3	30.34		7.95	11.34
5538-LP004-25-2				3.87		11.08					
5538-LP004-25-2-29											
5538-LP004-25-2-27							13.63	7.41		9.6	11.07
5538-LP004-25-2-26							5.02	22.04		6.95	9.61
5538-LP004-25-2-25							1.21	26.84		4.31	7.45
							5.83	34.16		8.77	11.58
5538-LP004-25-13				10.53		11.19					
5538-LP004-25-13-27											
							14.65	11.46		7.86	10.49

株 I D	T 2 プール		T 3 プール		T 3 選択		T 4 プール	
	$\Delta 6,9$ 18:2	GLA	$\Delta 6,9$ 18:2	GLA	$\Delta 6,9$ 18:2	GLA	$\Delta 6,9$ 18:2	$\Delta 6,9,12$ 18:3
5538-LP004-25-13-26					11.18	13.04	9.33	10.01
5538-LP004-25-13-25					4.18	36.78	7.2	12.22
5538-LP004-25-1			3.05	11.16				
5538-LP004-25-1-41					0	0	0.01	0.04
5538-LP004-25-1-28					3.43	19.98	4.63	6.53
5538-LP004-25-1-27					5.52	20.13	8.35	11.21
5538-LP004-25-1-26					0.1	23.16	5.52	8.59
5538-LP004-25-1-25					6.5	31.83	9.85	10.88

【0099】

本明細書中に記載の全ての出版物および特許出願が本発明に属することが当業

者に示される。本明細書において、全ての出版物および特許出願が、各出版物または特許出願が具体的かつ個別に参考として援用されることが示されるように、同一の文脈で参考として援用される。

【0100】

上記発明は理解を明確にする目的で図面および実施例によっていくらか詳細に記されているが、一定の変更および修正が添付の請求の範囲内で実施され得ることが自明である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ミード酸(20:3、 Δ 5、8、11)、アラキドン酸(20:4、 Δ 5、8、11、14)、およびステアリドン酸(18:4、 Δ 6、9、12、15)の、藻類、*Mortierella*およびヒトを含む種々の生物由来のパルミチン酸(C_{16})からの可能な生合成経路を示す図である。これらのPUFAは、ヒトおよび他の動物に重要な他の分子(プロスタサイクリン、ロイコトリエン、およびプロスタグランジンを含み、そのうちのいくつかを示した)の前駆体として作用し得る。

【図2】

ARAに加えて、種々の生物からさらに編成されたタキソレイン酸およびピノレイン酸を含むPUFAの可能な生合成経路を示す図である。

【図1】

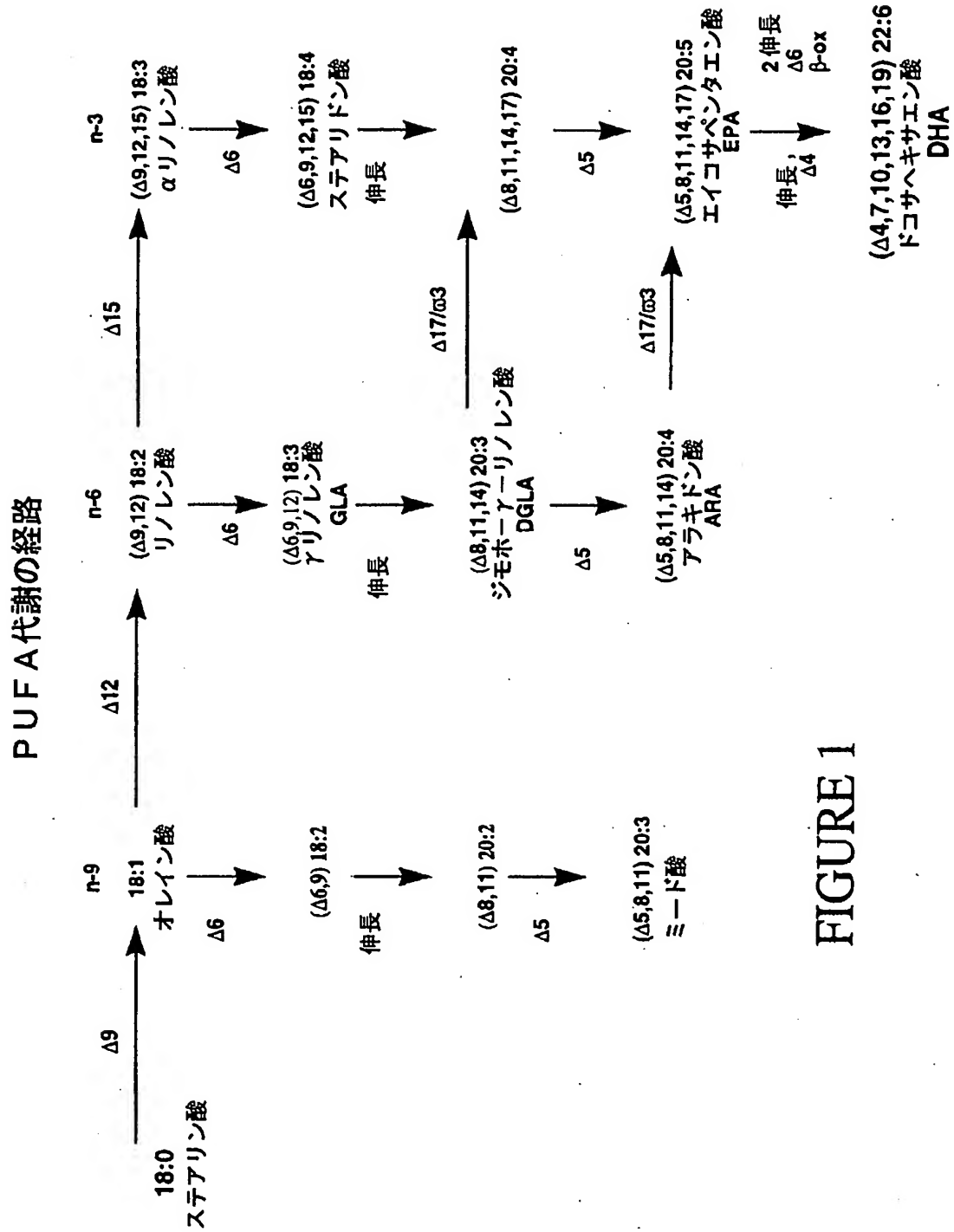


FIGURE 1

【図2】

PUFA代謝の経路
 $\Delta 5$ -不飽和化

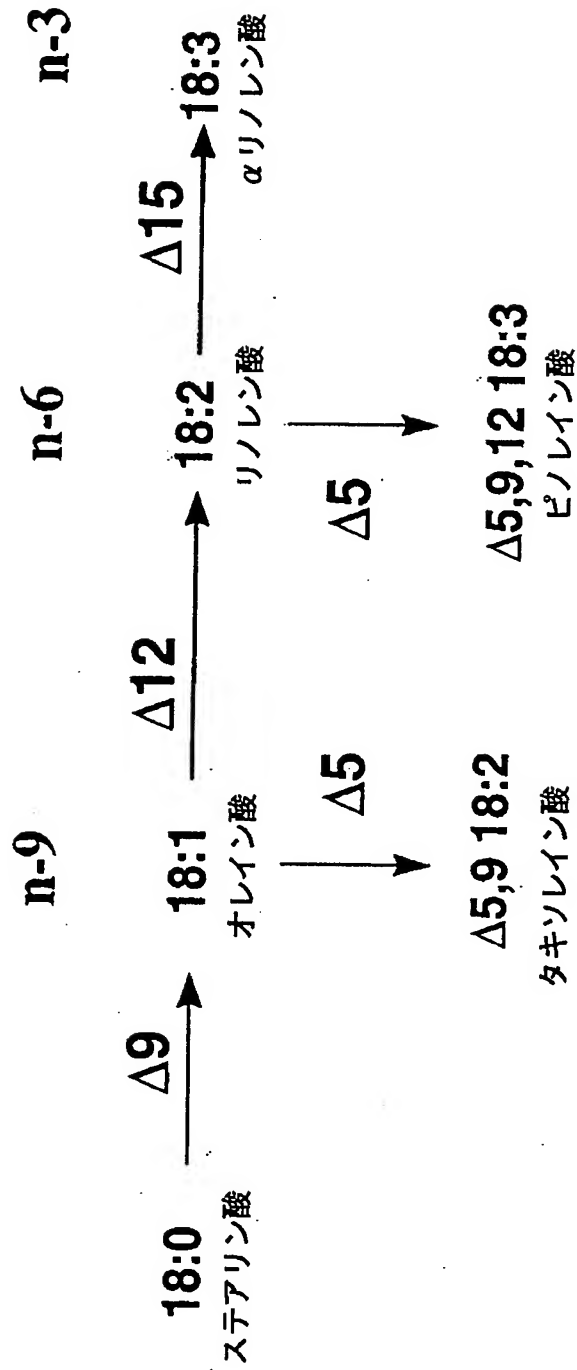


FIGURE 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/82 C12N9/02 A01H1/00		International Application No. PCT/US 99/13559
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 06712 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 15 April 1993 (1993-04-15) abstract page 4, line 12 - line 18 claims	1, 2, 4, 7-18 3, 6
Y	WO 94 18337 A (MONSANTO CO.; UNIV MICHIGAN (US); GIBSON SUSAN IRMA (US); KISHORE G) 18 August 1994 (1994-08-18) examples 2-4, 6	3, 6
X, P	WO 98 45460 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE; THOMAS TERRY L (US); BEREMAND PHILLIP D) 15 October 1998 (1998-10-15) abstract examples 1-4 claims	1, 2, 7-18
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2000		Date of mailing of the international search report 03/04/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6818 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 061 epo nl, Facs (+31-70) 340-0010		Authorized officer Panzica, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

BEST AVAILABLE COPY

(62)

特表2002-517255

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Initial and Application No PCT/US 99/13559
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ; CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) the whole document	1-4,7-18
A	WO 97 21340 A (CARGILL INC ; DEBONTE R LORIN (US); FAN ZHEGONG (US); LOH H T WILLI) 19 June 1997 (1997-06-19) abstract	3
A	US 5 057 419 A (MARTIN CHARLES E ET AL) 15 October 1991 (1991-10-15)	3

1

Form PCT/ISA/21e (continuation of annex A of July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/13559

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9306712 A	15-04-1993	AU 667848 B	18-04-1996
		AU 2881292 A	03-05-1993
		BA 61791 B	30-06-1998
		BA 98695 A	31-05-1995
		BR 9206613 A	11-04-1995
		CA 2120629 A	15-04-1993
		CN 1072722 A	02-06-1993
		CN 1174236 A	25-02-1998
		CZ 9400817 A	13-09-1995
		EP 0666918 A	16-08-1995
		HU 69781 A	28-09-1995
		JP 7503605 T	20-04-1995
		MX 9205820 A	01-04-1993
		NZ 244685 A	27-06-1994
		RO 113256 A	29-05-1998
		US 5552306 A	03-09-1996
		US 5614393 A	25-03-1997
		US 5689050 A	18-11-1997
		US 5663068 A	02-09-1997
		US 5789220 A	04-08-1998
		ZA 9207777 A	21-04-1993
WO 9418337 A	18-08-1994	EP 0684998 A	06-12-1995
		JP 8506490 T	16-07-1996
WO 9845460 A	15-10-1998	US 5959175 A	28-09-1999
		AU 6963498 A	30-10-1998
WO 9846763 A	22-10-1998	US 5968809 A	19-10-1999
		AU 6961698 A	11-11-1998
		AU 7114798 A	11-11-1998
		EP 0975766 A	02-02-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		NO 9846764 A	22-10-1998
WO 9721340 A	19-06-1997	AU 1293297 A	03-07-1997
		CA 2238964 A	19-06-1997
		EP 0880312 A	02-12-1998
US 5057419 A	15-10-1991	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)